

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U. N° 66

RAPPORTS
ENTRE LES
STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES
ET LES
STAPHYLOCOQUES NON PATHOGÈNES

THÈSE
POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

1943

PAR

Michel MONIN

JURY { MM. RÉGNIER, *Président.*
JANOT, *Professeur.*
VALETTE, *Maitre de Conférences.*

PARIS

JOUBE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1943

FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Nom du Candidat : **MONIN.**

Prénom : **Michel.**

Date de la soutenance :

Numéro d'ordre

1

MONIN (Michel). — Rapports entre les Staphylocoques pathogènes et les Staphylocoques non pathogènes. — *Paris, Jouve et C^{ie}, 1943, in-8°, VIII + 88 p.*

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris, 1943. Série U. N° 66.

2

MONIN (Michel). — Rapports entre les Staphylocoques pathogènes et les Staphylocoques non pathogènes. — *Paris, Jouve et C^{ie}, 1943, in-8°, VIII + 88 p.*

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris, 1943. Série U. N° 66.

3

MONIN (Michel). — Rapports entre les Staphylocoques pathogènes et les Staphylocoques non pathogènes. — *Paris, Jouve et C^{ie}, 1943, in-8°, VIII + 88 p.*

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris, 1943. Série U. N° 66.

4

MONIN (Michel). — Rapports entre les Staphylocoques pathogènes et les Staphylocoques non pathogènes. — *Paris, Jouve et C^{ie}, 1943, in-8°, VIII + 88 p.*

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris, 1943. Série U. N° 66.

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U. N° 66

RAPPORTS

ENTRE LES

STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES

ET LES

STAPHYLOCOQUES NON PATHOGÈNES

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

1943

PAR

Michel MONIN

JURY

{ MM. RÉGNIER, *Président.*
JANOT, *Professeur.*
VALETTE, *Maître de Conférences.*

PARIS

JOUBE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1943

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. DAMIENS, *Doyen*, O. ✱, **QI**.
H. HERISSEY, *Assesseur*, O. ✱, **QI**.
H. J. LIONNET, *Secrétaire*, **QI**.

PROFESSEURS

MM. DAMIENS, O. ✱, QI	Chimie minérale.
HERISSEY, O. ✱, QI	Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, QI	Chimie organique.
FABRE, ✱, QI	Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, QI	Zoologie.
DELABY, ✱, QI	Pharmacie chimique.
PICON, ✱, QI	Physique.
MASCRE, ✱, QI	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
BACH, ✱, QI	Botanique.
FLEURY, QI	Chimie analytique.
RÉGNIER, QI	Microbiologie.
JANOT, QA	Pharmacie galénique.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. ✱, **QI**. — GUÉRIN, O. ✱, **QI**.

Professeurs honoraires :

MM. DELÉPINE, O. ✱, **QI** et LEBEAU, O. ✱, **QI**, Membres de l'Institut.
PERROT, C. ✱, **QI**, COUTIÈRE, O. ✱, **QI**, BOUGAULT, O. ✱, **QI**,
LUTZ, ✱, **QI**, GORIS, O. ✱, **QI**.

MAITRES DE CONFÉRENCES

BEDEL, ✱, QI	Minéralogie, Législation et Déontologie pharmaceutiques.
CHARONNAT, QI	Hydrologie et Hygiène.
VALETTE, QA	Cryptogamie et Technique microbiologique. Pharmacodynamie.
FONTAINE.	Histoire naturelle.
GUILLOT.	Sciences physiques et chimiques.
PARIS.	Botanique et matière médicale.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE, QA , trav. pratiques de 1 ^{re} année.	Chimie générale et pharmaceutique.
GAUTIER, QA , trav. prat. de 2 ^e et 3 ^e année.	Chimie analytique.
N.	Micrographie.
CORRIEZ, QA	Physique.
DAVID, QI	Microbiologie.
COURTOIS,	Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, **QA**.

Bibliothécaire : M^{lle} LAUDAUD, **QA**.



A MES GRANDS-PARENTS

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

A MONSIEUR LE PROFESSEUR DUFRAISSE

Professeur au Collège de France

*En le remerciant de la bienveillance qu'il
m'a toujours témoignée.*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MON JURY DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. RÉGNIER

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien-Chef des Hôpitaux de Paris

*Qui a bien voulu nous faire l'honneur
d'accepter la présidence de cette thèse.*

MONSIEUR LE PROFESSEUR JANOT

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

MONSIEUR LE MAÎTRE DE CONFÉRENCE VALETTE

Maître de conférence à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien-Chef des Hôpitaux de Paris

A MONSIEUR LE PROFESSEUR G. RAMON

Directeur de l'Institut Pasteur de Garches

A MONSIEUR LE DOCTEUR R. KOURILSKY

Médecin des Hôpitaux

Chef de Service à l'Hôpital Raymond-Poincaré

Avant de présenter notre travail, c'est un devoir particulièrement agréable pour nous de remercier M. le Professeur J. RÉGNIER d'avoir bien voulu accepter la présidence de cette thèse et de nous avoir constamment guidés dans l'élaboration de cette étude.

Nos remerciements iront également à M. le Professeur G. RAMON, directeur de l'Institut Pasteur de Garches, qui a bien voulu nous ouvrir les portes de ses services.

Nous exprimerons aussi notre vive gratitude à M. le Dr R. KOURILSKY et à son chef de laboratoire, M. le Dr P. MERCIER, qui nous ont si aimablement accueilli dans leur laboratoire et nous ont initié à leurs techniques avec beaucoup de bienveillance et auxquels ce travail doit beaucoup.

RAPPORTS

ENTRE LES STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES ET LES STAPHYLOCOQUES NON PATHOGÈNES

PRÉAMBULE

Chez l'homme et chez l'animal, aucune infection n'est plus fréquente, plus banale, plus universellement répandue que la maladie staphylococcique. Le staphylocoque est l'agent principal de la plupart des suppurations aiguës — notamment de celles du revêtement cutané et de ses annexes (poils, glandes sébacées) — depuis les lésions de l'acné pustuleuse jusqu'aux furoncles, anthrax et abcès sous-cutanés, quel qu'en soit le siège. Du tégument, le staphylocoque peut gagner le tissu conjonctif profond et engendrer le phlegmon, notamment au doigt le panaris dans toutes ses variétés, depuis la tourniole jusqu'au panaris osseux. Lorsque le microbe passe dans le sang, il détermine des septicémies souvent très graves, rappelant l'infection typhoïdique, et provoquant l'apparition de suppurations viscérales diverses, au niveau du foie, du poumon, mais avec une prédilection marquée pour les os (ostéomyélite)

et la graisse péri-rénale (phlegmon péri-néphrétique). En dehors de ces manifestations plus exceptionnelles, les atteintes du tégument sont nombreuses et quotidiennes. Leur fréquence s'explique d'ailleurs par l'ubiquité du staphylocoque, mise en évidence par PASTEUR en 1878 dans des eaux communes, et confirmée par d'autres auteurs tels que ROSENBACH, OGSTON, WELCH et LINGELSHEIM qui ont retrouvé la bactérie dans l'air, dans l'eau, dans les poussières, sur la peau de l'homme et sur le cuir chevelu. Rien d'étonnant donc que le revêtement cutané, véritable écran entre l'organisme et le milieu extérieur, ne soit fréquemment le siège des atteintes staphylococciques.

Cependant le problème de l'infection staphylococcique n'est pas résolu pour autant, car dès la découverte du staphylocoque, on constata des différences très grandes entre les souches de provenances diverses : celles que l'on isole des lésions en évolution sont pathogènes pour l'animal inoculé ; par contre, celles que l'on retire de l'air ou du tégument sont habituellement douées d'une virulence faible ou nulle.

En réalité, il y a quelques années encore, l'étude du staphylocoque et de ses poisons paraissait résolue. C'était un germe se présentant sous forme de cocci arrondis, isolés ou groupés en chaînettes ou plus souvent en amas, gardant la coloration de Gram, et présentant des colonies soit jaune-orangées (staphylocoque doré) soit jaune-citrines (sta-

phylocoque citrin) soit blanches (staphylocoque blanc). On savait également que le staphylocoque doré était le plus souvent isolé des lésions, mais que les autres variétés pouvaient être également pathogènes. C'est ainsi que NEUMANN avait montré que par repiquage d'une seule colonie de staphylocoque doré, on pouvait obtenir les trois sortes de germes. On savait également qu'il existait dans la nature une foule de cocci ayant la morphologie du staphylocoque ; « ces germes » disait-on « restaient sans action sur la gélatine, alors que les pathogènes liquéfiaient ce milieu ».

D'autre part l'action fermentaire sur les sucres était considérée comme très variable d'un échantillon à l'autre, et A. PHILIBERT concluait que le staphylocoque pris dans son sens le plus large était très répandu dans tout le milieu extérieur et présentait des adaptations avec les circonstances dans lesquelles il se trouvait placé. « C'est affaire de botaniste » dit cet auteur « d'établir des distinctions d'espèces pour toutes ces catégories, capables des mutations les plus étendues ».

C'est donc le problème de l'unité ou de la pluralité de ce microbe qui est posé. Nous pouvons considérer que le botaniste peut intervenir d'une manière efficace pour le résoudre, mais il nous semble que c'est davantage par l'étude physiologique et biochimique de ce germe qu'on doit arriver à différencier les espèces pathogènes des espèces saprophytes.

Dès lors se trouve posée la question de savoir quel est, d'une façon générale, le rapport entre les staphylocoques saprophytes et les staphylocoques pathogènes. La plupart des travaux consacrés depuis quarante ans à l'aptitude pathogène du staphylocoque se sont orientés dans cette direction et, en particulier, les auteurs se sont appliqués à dégager les caractères différentiels entre les souches pathogènes et les souches saprophytes.

Comme nous le verrons, toutes les propriétés antigéniques et biochimiques ont été au fur et à mesure de leur découverte, utilisées à définir les germes pathogènes, mais ni la chromogénèse, ni l'hémolysine, ni les propriétés fermentaires, ni les réactions d'agglutination n'ont permis de dégager un test absolu de l'aptitude pathogène du staphylocoque. En 1940, R. KOURILSKY et P. MERCIER ont pu dégager une méthode simple de dosage *in vivo* du pouvoir pathogène ; d'autre part, ils ont pu, grâce à l'expérimentation, faire varier le pouvoir pathogène du staphylocoque en déterminant un affaiblissement du pouvoir pathogène des souches issues de lésions en évolution, et d'autre part, en conférant rapidement l'aptitude pathogène à des bactéries saprophytes. En collaboration avec ces deux auteurs, nous avons repris depuis un an, sur des bases expérimentales nouvelles, le problème des rapports entre les staphylocoques pathogènes et les staphylocoques saprophytes. Les résultats que nous avons obtenus font l'objet de la présente étude.

Nous nous proposons dans ce travail de montrer comment les variations du pouvoir pathogène peuvent être obtenues, et pour cela, nous envisagerons en premier lieu, quelles sont les méthodes proposées par différents auteurs pour distinguer les souches saprophytes des souches pathogènes ;

dans un deuxième temps, nous étudierons les variations spontanées des staphylocoques au sein même de l'organisme humain ;

dans une troisième phase, nous essaierons de faire varier l'aptitude pathogène du staphylocoque en inoculant le germe sur une muqueuse, dans la peau, dans le sang, dans différents viscères et dans une séreuse ; ensuite nous chercherons à faire apparaître une aptitude pathogène élevée à un staphylocoque saprophyte par inoculation chez l'animal dans un tissu en voie d'autolyse ;

enfin, nous essaierons d'effectuer des variations de la pathogénèse du staphylocoque par des procédés exclusivement *in vitro* ;

dans un sixième chapitre, nous étudierons les propriétés fermentaires et antigéniques des souches ayant acquis l'aptitude pathogène.

Le plan que nous suivrons peut se résumer ainsi :

CHAPITRE I. — Caractères différentiels entre les staphylocoques pathogènes et les staphylocoques saprophytes.

CHAPITRE II. — Variations spontanées des staphylocoques au sein de l'organisme humain.

CHAPITRE III. — Variations expérimentales de l'aptitude pathogène du staphylocoque par inoculation du germe sur une muqueuse, dans la peau, dans le sang, dans les viscères et dans une séreuse.

CHAPITRE IV. — Accroissement du pouvoir pathogène d'un staphylocoque saprophyte par inoculation dans un tissu en voie d'autolyse inséré à l'animal.

CHAPITRE V. — Essais d'accroissement du pouvoir pathogène *in vitro*.

CHAPITRE VI. — Etude des propriétés fermentaires et antigéniques des souches ayant subi une variation quelconque du pouvoir pathogène.

HISTORIQUE

Dès les premières recherches consacrées à la culture du staphylocoque, on remarqua que les germes issus des lésions étaient ordinairement dorés et quelquefois citrins. Par contre, les staphylocoques blancs paraissaient absolument inoffensifs pour l'animal d'expérience. C'est ainsi que J. KOCH étudiant la flore de la peau, des cheveux et des vêtements, a trouvé 90 fois sur 100 des staphylocoques blancs, tous dénués de pouvoir pathogène. Mais divers auteurs, et notamment KOLLE et OTTO, LUBINSKI et WINSLOW ont montré que le parallélisme entre le pigment et l'aptitude pathogène du staphylocoque n'était pas rigoureux et, de fait, des souches blanches peuvent être pathogènes. LUBINSKI a établi que, pour une même souche, le pigment variait avec l'âge de la culture et avec la quantité d'oxygène offert à la bactérie. Le pigment se perd rapidement par le passage répété sur l'animal et par la culture en anaérobiose. La pigmentation du staphylocoque n'est donc pas un caractère suffisamment général pour affirmer que le germe est doué ou non d'aptitude pathogène. Tout au

plus le pigment doré constitue-t-il un signe de présomption en faveur des staphylocoques pathogènes.

Lorsque la propriété hémolytique eut été découverte par KRAUSSE en 1900, plusieurs auteurs tels que NEISSER et WECHSBERG, Van DURME, JOCHMAN, J. KOCH et NOGUCHI ont essayé d'établir une équation entre l'activité pathogène et l'élaboration d'hémolysine. Mais des recherches ultérieures entreprises par DREYER, AXENFELD, KUTSCHER et KONRICH ont montré que beaucoup de souches saprophytes sont hémolytiques sur plaque de gélose au sang. Plus tard, les procédés de titrage de l'hémolysine obtenue par culture en bouillon, en atmosphère de gaz carbonique et d'air ont indiqué le parallélisme *habituel, mais non obligatoire* entre l'hémolysine et le pouvoir pathogène.

L'aptitude des souches pathogènes à faire fermenter certains sucres a été démontrée par GORDON en 1903 et ses travaux furent confirmés par WINSLOW en 1920 et DUDGEON en 1927. Il paraît résulter que la propriété la plus intéressante des staphylocoques pathogènes est la fermentation du mannitol. D'autre part, l'élaboration de coagulase, ferment découvert par LOEB en 1903, et ayant la propriété de coaguler le plasma oxalaté ou citraté, d'homme ou de lapin, est étroitement en rapport avec l'aptitude pathogène, comme l'ont montré MUCH, DARANYI, GROSS et plus récemment CHAPMAN, THOMPSON et KHORAZO.

Beaucoup moins fidèle s'est révélée la leucocidine,

ferment produisant la destruction des leucocytes, mis en valeur en 1894 par DENYS et Van DE VELDE, puis étudié par J. KOCH, JULIANELLE, PIKE et surtout par PANTON et VALENTINE.

En 1902, KOLLE et OTTO ont établi une première classification des staphylocoques sur une base antigénique. D'après ces auteurs, les staphylocoques issus du pus étaient tous agglutinés par les immun-sérums préparés contre l'un de ces germes, alors que les souches d'autres provenances ne l'étaient pas. La majorité de ces souches agglutinables étaient dorées et pathogènes pour la souris. De nombreux auteurs ont, dans les années suivantes, confirmé le travail de KOLLE et OTTO : ce sont PROESCHER, VEIEL, KUTSCHER, KONRICH, FRAENKEL et BAUMAN, NOGUCHI, DREYER et NOTHMANN, GEISSE, WALKER et ADKINSON. Plus tard on a préféré recourir à l'absorption des agglutinines.

Pour JULIANELLE il existe 3 groupes antigéniques, 3 également pour HOPKINS, 4 au moins pour THOMPSON et KHORAZO : un groupe A comprenant les staphylocoques pathogènes, des groupes B et C pour les staphylocoques saprophytes. Certains germes sont agglutinés à la fois par les anti-sérums B et C. Enfin, le groupe O comprend les staphylocoques de l'air, non agglutinables. Mais il est à noter que certaines souches pathogènes n'appartiennent pas au groupe A et se comportent à l'agglutination comme des germes B ou C.

Un pas de plus a été fait dans la classification des

staphylocoques sur la base antigénique, grâce à JULIANELLE et WIEGHARD qui, en 1935, ont trouvé que les staphylocoques provenant de lésions en évolution renfermaient un polysaccharide spécifique A, précipitable, différent au point de vue chimique et antigénique du polysaccharide B découvert dans les souches d'autres provenances.

En outre en 1940, VERWEY a mis en évidence dans les staphylocoques du groupe A, l'existence d'une protéine A spécifique.

Notons que CHAPMAN et BERENS ont enfin proposé de différencier les staphylocoques pathogènes des staphylocoques saprophytes par la réaction du violet cristallisé. En cultivant le staphylocoque sur gélose contenant 1/300.000^e de violet cristallisé, ces auteurs ont remarqué que les souches non pathogènes restaient blanches, tandis que les souches pathogènes prenaient une teinte violette, ou bien, si elles étaient dorées, présentaient à la périphérie de la culture une aréole violette.

Enfin en 1940, R. KOURILSKY et P. MERCIER ont proposé une méthode biologique pour caractériser les staphylocoques pathogènes et les différencier des staphylocoques saprophytes, en inoculant les cultures au lapin, à des dilutions croissantes, et en examinant 4 jours après l'inoculation, la réponse du tégument de l'animal à l'injection bactérienne.

Nous avons successivement utilisé ces diverses méthodes pour éprouver les staphylocoques que nous avons étudiés. Nous allons en décrire les techniques avec quelques détails.

CHAPITRE I

Caractères différentiels entre les staphylocoques pathogènes et les staphylocoques saprophytes.

Au fur et à mesure de la découverte des propriétés fermentaires et antigéniques du staphylocoque, les auteurs ont essayé de dégager celles de ses propriétés qui permettraient de différencier d'une manière certaine les staphylocoques pathogènes et les staphylocoques non pathogènes. Parmi tous les caractères qui ont été successivement proposés pour effectuer ces distinctions, nous retiendrons d'abord la fermentation du mannitol, puis la production de ferment coagulant par les staphylocoques pathogènes, la sécrétion d'une hémolysine spécifique, la réaction au violet cristallisé, l'agglutination, et enfin la méthode de KOURILSKY-MERCIER sur le dosage du pouvoir pathogène *in vivo*. Nous allons passer en revue les techniques de ces essais.

TECHNIQUES

I. — Fermentation du mannitol.

La culture du staphylocoque est effectuée en tubes de 10 cc. d'eau peptonée à 2 % dans lesquels on a ajouté 0,5 cc. d'une solution de mannitol à 1 %. Après un séjour de 48 heures à l'étuve à 37°, le pH de la culture, témoignant ou non de la fermentation de ce poly-alcool, a été recherché par addition de quelques gouttes d'indicateur universel Prolabo, dont nous n'avons pas été autorisé à donner ici la formule.

Avec les souches pathogènes, le pH de la culture descend à $\text{pH} = 4$ et même à $\text{pH} = 3$, alors que les souches non pathogènes n'entraînant aucune fermentation du mannitol, conservent à la culture un pH de 7.

II. — Production du ferment coagulant.

LOEB en 1903 a remarqué que les staphylocoques pathogènes avaient le pouvoir de coaguler le plasma humain préalablement oxalaté. Nous avons utilisé sa technique et pour cela nous avons prélevé 10 cc. de sang humain dans un ballon renfermant 0,02 gr. d'oxalate de potassium. Le mélange a été ensuite centrifugé à 6.000 tours par minute pendant 20 minutes et le plasma a été recueilli. Il peut se conserver sans altération pendant 6 semaines à la glacière.

La recherche de la coagulase se pratique de la façon suivante : on mélange dans un tube à hémolyse 0,3 cc. du plasma humain et 0,2 cc. d'une culture en bouillon ordinaire de staphylocoque, datant de 24 heures. Après avoir agité le tube, on le met à l'étuve à 37° pendant 24 heures, tout en surveillant l'apparition de la coagulation au bout de : 1/2 heure, 1 heure, 2 heures, 4 heures et 24 heures. Il semble que plus l'aptitude pathogène du staphylocoque est élevée, plus la coagulation est rapide.

III. — Sécrétion de l'hémolysine spécifique.

La plupart des auteurs étrangers ont recherché la production d'hémolysine en ensemençant le staphylocoque sur des boîtes de Pétri renfermant de la gélose au sang. Nous avons préféré utiliser des procédés plus compliqués, il est vrai, mais plus sûrs, qui permettent l'obtention de la toxine staphylococcique destinée à être transformée en anatoxine.

A. — *Les milieux de culture.*

Nous avons utilisé plusieurs milieux de culture préconisés par G. RAMON pour la production habituelle de l'anatoxine staphylococcique.

L'un d'eux n'est autre que celui employé pour l'élaboration de la toxine diphtérique. Il est ainsi préparé : A 1 litre d'eau on ajoute 10 cc. d'acide chlorhydrique officinal, et 225 grammes de panse de porc fraîche finement hachée. On porte au bain-

marie à 45° durant 2 heures, puis on ajoute 325 gr. de viande de veau hachée. On brasse le mélange et on laisse à la température du laboratoire pendant 20 heures. On arrête alors la digestion par chauffage à 100°. On filtre sur étamine puis on amène à pH = 6,8 ou 7 au moyen de lessive de soude. On chauffe à nouveau à 100° pendant 20 minutes ; on filtre alors sur papier Joseph. On répartit en ballons de Fernbach ; on stérilise à 100° durant 20 à 25 minutes. Ce milieu, additionné de sucre (glucose : 1 gramme, ou maltose : 2 grammes par litre) estensemencé à l'aide de la souche à étudier.

Un autre milieu plus simple, préconisé également par G. RAMON pour l'obtention de la toxine staphylococcique est celui que Miss TAYLOR, de Toronto (Canada) a proposé pour l'élaboration de la toxine diphtérique ; ce milieu se prépare de la manière suivante : On utilise pour chaque préparation 10 panses de porcs tués 3 ou 4 heures auparavant. Après avoir éliminé la graisse au moyen de ciseaux, on coupe chaque panse en deux, on rince à l'eau tiède, et finalement on hache les fragments de panse. Ce hachis de panse est introduit dans des ballons de 4 litres, dans lesquels on a préalablement mélangé 3.200 cc. d'eau stérile à 45° et 32 cc. d'acide chlorhydrique concentré ; on ajoute 350 grammes de hachis par litre. Le mélange est brassé, puis porté au bain-marie à 45° et la digestion se poursuit durant 23 heures. Après filtration on chauffe le liquide à 95° et on le dépose toute la nuit en glacière. Il se

forme une grande quantité de précipité que l'on sépare par siphonnage. Le bouillon est alors ajusté à $\text{pH} = 7,4$ avec une solution de lessive de soude, puis on stérilise à l'autoclave à 110° durant 40 minutes.

D'autres souches ont été ensemencées sur un milieu de culture de composition chimique bien définie, mis au point par G. RAMON, A. BOIVIN et R. RICHOU ; sa préparation est la suivante : On fait dissoudre à chaud 15 grammes de gélatine dans 10 cc. d'acide sulfurique 2 fois normal, puis on chauffe la solution pendant 3 heures à l'autoclave sous 2 kilogrammes de pression. Les acides aminés sont libérés. On élimine l'acide sulfurique par la baryte en évitant soigneusement tout excès de ce dernier réactif. On ajoute à l'hydrolysate 0,10 gr. de tyrosine, 0,10 grammes de cystine, 0,05 grammes de tryptophane, 7 grammes de phosphate monopotassique et 5 grammes de citrate trisodique. On complète à 1 litre avec de l'eau distillée. On amène à $\text{pH} = 7,4$ et l'on stérilise 20 minutes à 110° .

D'autre part on dissout 4 grammes de glucose, 0,10 grammes de sulfate de magnésium, 0,001 gr. d'acide nicotinique et $1/20^{\circ}$ de milligramme d'aneurine, dans 20 cc. d'eau distillée, et l'on stérilise à 110° pendant 20 minutes.

Finalement on réunit les deux solutions et l'on abandonne le mélange à 37° pendant 48 heures à l'étuve pour en contrôler la stérilité.

Enfin nos tout derniers essais en vue de la recherche de l'hémolysine staphylococcique ont été effec-

tués à l'aide d'un nouveau milieu mis au point par G. RAMON, P. MERCIER, J. POCHON et M^{lle} G. AMOUREUX. Il est basé sur la digestion papaïnique de viande de cheval. Voici sommairement décrite la technique de préparation : 4 kilogrammes de viande de cheval, dégraissée et hachée sont mis dans 18 litres d'eau préalablement portée à 50°, en cuve de porcelaine. Le mélange est chauffé au bain-marie et quand la température atteint à nouveau 30° on ajoute 36 grammes (soit 2 grammes par litre) de papaine. On chauffe alors de telle sorte que la température s'élève à 85° en 1 heure. La digestion s'opère rapidement ; le liquide est alors siphonné, filtré sur papier mou, amené à pH = 7,5, chauffé pendant 15 minutes à 90° et filtré sur papier dur. Le bouillon est ensuite réparti en ballons de Fernbach d'une contenance de 2 litres à raison de 1 litre par ballon, et stérilisé à l'autoclave à 110° pendant 30 minutes.

B. — *Les cultures.*

Ces différents milieux de culture, répartis en ballons de Fernbach, sous un volume de 1 litre, ont étéensemencés avec la souche de staphylocoques à étudier, puis abandonnés à l'étuve à 37° durant 6 jours sous un courant d'air additionné de gaz carbonique dans les proportions suivantes : air 80 %, gaz carbonique 20 %. Les cultures sont filtrées au sixième jour, d'abord sur des filtres d'amiante, puis sur bougie Chamberland L 3.

Le dosage de l'hémolysine obtenue est effectué en recherchant *la dose minima hémolytique*, c'est-à-dire la plus petite quantité de toxine qui hémolyse I goutte de globules rouges de lapin dilués au tiers. Lorsque l'hémolysine obtenue est puissante, on recherche *la dose combinée hémolytique*, c'est-à-dire la plus petite quantité d'hémolysine qui, ajoutée à 1 unité d'antitoxine, est encore capable d'hémolyser I goutte de globules rouges de lapin dilués au tiers.

A noter qu'il faut tenir compte exclusivement de l'hémolyse *totale*.

IV. — Réaction du violet cristallisé.

En 1935, CHAPMAN et BERENS ont proposé une nouvelle méthode de différenciation entre les staphylocoques pathogènes et les staphylocoques saprophytes en utilisant la gélose au violet cristallisé.

Celle-ci est formée de gélose nutritive ordinaire à laquelle on ajoute 1 cc. d'une solution de violet cristallisé au 1/300 millième.

Nous avons préféré employer une solution au 1/400 millième, car le violet cristallisé est un antiseptique puissant et nous avons pu constater que si l'on employait la dilution de 1/300 millième, les cultures restaient souvent stériles.

Dans ces conditions, les staphylocoques pathogènes donnent après 24 heures de séjour à l'étuve à 37°, des colonies violettes ou des colonies dorées

cerclees de violet, alors que les germes saprophytes ne donnent naissance qu'à des colonies entièrement blanches.

V. — Agglutination.

Pour préparer un sérum agglutinant, nous avons injecté à 6 lapins par voie endo-veineuse des suspensions de différents germes, tyndallisées au préalable par chauffage intermittent au bain-marie à 56° pendant 3 heures.

Deux des lapins reçurent des injections préparées à l'aide des souches toxigènes utilisées pour la production habituelle de la toxine staphylococcique (souche 72 de NELIS et souche WOOD.).

Deux autres lapins furent injectés avec des souches récemment isolées de lésions en évolution (abcès et ostéomyélite).

Enfin, les deux derniers lapins furent soumis à une série d'injections de souches non pathogènes (souche F. et souche CORB.).

Le rythme et la posologie des injections furent les suivants :

pendant 3 jours consécutifs, injection de 0,5 cc. de la suspension staphylococcique antigène (environ 1 milliard de germes par cc.) ;

repos de 8 jours ;

puis, reprise des injections pendant 3 jours à la dose de 1 cc. ;

nouveau repos de 8 jours ;

nouvelles injections durant 3 jours de 1,5 cc. de suspension staphylococcique ;

repos de 8 jours ;

dernières injections pendant 3 jours encore à la dose de 2 cc. ;

15 jours après la dernière injection, les animaux furent saignés à la veine marginale de l'oreille et leur sérum fut titré pour évaluer leur teneur en agglutinines. Cette recherche a été effectuée d'une part avec les souches homologues, d'autre part avec les souches hétérologues. Nous allons résumer dans le tableau I ci-dessous les résultats de ces titrages.

TABLEAU I
Taux des agglutinines.

Nature du sérum	Nature de la suspension antigène	Aptitude pathogène de la souche	Taux des agglutinines
Anti-sérum 72	Souche 72 (toxigène)	Pathogène	1/10.000 ^e
Anti-sérum 72	Souche Berg.	Abcès	1/10.000 ^e
Anti-sérum 72	Souche F.	Fosses nasales (saprophyte)	1/20 ^e
Anti-sérum Berg.	Souche Wood.	Toxigène	1/1.000 ^e
Anti-sérum Berg.	Souche F.	Fosses nasales (saprophyte)	1/20 ^e
Anti-sérum Berg.	Souche Berg.	Abcès	1/10.000 ^e
Anti-sérum F.	Souche 72	Pathogène	1/50 ^e
Anti-sérum F.	Souche F.	Fosses nasales (saprophyte)	1/10.000 ^e
Anti-sérum Wood.	Souche 72	Pathogène	1/10.000 ^e
Anti-sérum Wood.	Souche F.	Fosses nasales (saprophyte)	1/20 ^e

Ces différentes mesures furent effectuées par agglutination macroscopique après un séjour de 24 heures à l'étuve à 37° du mélange sérum-antigène.

VI. — Technique de la mesure du pouvoir pathogène « *in vivo* ».

Poursuivant leur recherche sur l'aptitude pathogène des staphylocoques issus des fosses nasales de l'homme, R. KOURILSKY et P. MERCIER ont été amenés en 1940 à proposer une méthode de dosage *in vivo* du pouvoir pathogène (1).

Technique de cette mesure.

La souche de staphylocoques est ensemencée sur gélose inclinée dès qu'elle est obtenue en culture pure. Après 24 heures d'étuve à 37°, cette culture est émulsionnée dans 10 cc. d'eau physiologique stérile, et c'est à partir de cette émulsion mère qu'on effectue des dilutions croissantes depuis 1/10^e jusqu'à 1/2.000^e toujours à l'aide d'eau physiologique stérile. Vingt-quatre heures avant d'injecter les dilutions, on épile soigneusement un lapin avec une solution de sulfure de baryum ; on choisit un

(1) On entend ordinairement sous le terme de pouvoir pathogène, l'ensemble des manifestations nocives que l'on peut classer en virulence et pouvoir toxigène. Il s'agit alors d'un pouvoir pathogène général.

Au contraire, au cours de notre travail, nous ne considérerons que le pouvoir pathogène local, cutané, dont la définition est donnée ci-dessus, et qui ne représente qu'une des manifestations du pouvoir pathogène général.

lapin blanc de préférence, exempt d'antitoxine staphylococcique d'origine naturelle (1). Au moment des injections, chacun des flancs du lapin est divisé en 6 compartiments et dans chacun d'eux on injecte sous la peau une dilution différente de l'émulsion staphylococcique, toujours sous le volume de 1 cc. et en commençant par la plus grande dilution (1/2.000^e). Le lapin est observé pendant 5 jours pour noter les réactions qu'il peut présenter. En général, il se produit dès le premier jour, autour du point d'injection, une aréole inflammatoire qui s'étale les jours suivants, puis s'infiltré d'œdème et qui, lorsque la souche injectée est très pathogène, se termine par une escarre. Les réactions maxima surviennent au quatrième jour après l'injection. C'est à ce moment que se fait la lecture du pouvoir pathogène. On constate alors sur les flancs du lapin une série de nodules ou de plaques inflammatoires de dimensions variables correspondant aux diverses dilutions ; lorsque les dilutions sont trop fortes, aucune trace d'inflammation n'est visible. Il suffit de noter la dilution qui correspond à l'apparition de la première réaction inflammatoire nette au quatrième jour. Ce chiffre sert de mesure au pouvoir pathogène.

Si, pour prendre un exemple, une souche provoque la première réaction inflammatoire nette à la

(1) Pour cela ces auteurs ont cherché si le sérum du lapin renfermait moins de 1/10 d'unité d'antitoxine staphylococcique, en suivant la méthode du dosage par l'hémolyse.

dilution de $1/1.000^e$ alors que les dilutions plus grandes sont sans effet, le pouvoir pathogène de cette souche est $1/1.000^e$.

* * *

Nous sommes donc en possession maintenant de plusieurs méthodes pour apprécier la pathogénèse du staphylocoque ; elles vont nous permettre d'aborder avec précision l'étude des variations spontanées ou provoquées de ce germe.

CHAPITRE II

Variations spontanées des staphylocoques au sein de l'organisme humain.

On sait depuis quelques années que les fosses nasales de l'homme constituent un habitat normal du staphylocoque ; les auteurs anglais, en particulier A. Mc. FARLAN, E. H. GILLEPSIE, E. A. DEVENISH et S. T. COWAN ont établi que sur 100 individus normaux, 43 hébergeaient dans le nez des staphylocoques doués de pouvoir pathogène. R. KOURILSKY et P. MERCIER ont confirmé en 1940 les affirmations des auteurs anglais en examinant la flore nasale d'individus normaux, de sujets atteints d'infections staphylococciques en évolution, et enfin de diabétiques porteurs ou non de manifestations staphylococciques ; ils ont constaté que 86 % des sujets examinés hébergeaient du staphylocoque dans le nez.

Nous avons repris nous-même la question en 1941 sur les mêmes bases et au cours de notre étude nous avons pu démontrer que le transfert sur la muqueuse nasale d'un staphylocoque de pouvoir patho-

gène élevé, prélevé sur le tégument, à distance du foyer, s'accompagnait d'une réduction de pouvoir pathogène. Pour cela nous avons titré par la méthode biologique de mesure de l'aptitude pathogène du staphylocoque, les germes du foyer et ceux recueillis dans les fosses nasales antérieures.

Alors que les staphylocoques issus d'un anthrax par exemple, titraient $1/500^e$, les germes issus du nez prélevés au moment même de l'infection staphylococcique titraient $1/250^e$.

Un nouvel examen pratiqué un mois après la guérison de l'anthrax nous a permis de constater que les germes prélevés au niveau des fosses nasales antérieures ne titraient plus que $1/100^e$ à peine. En même temps, la chromogénèse des germes avait varié puisque les staphylocoques issus de l'anthrax et du nez étaient dorés au moment de la manifestation staphylococcique et qu'un mois après on trouvait à la fois des germes blancs et des germes dorés. Malgré cette pigmentation différente, les deux germes avaient un pouvoir pathogène identique.

Des examens répétés nous ont permis de voir que le taux du pouvoir pathogène du staphylocoque des fosses nasales finissait par tomber peu à peu à $1/10^e$. C'est ce taux que l'on trouve chez des sujets normaux.

L'étude des staphylocoques extraits des fosses nasales et le titrage de leur pouvoir pathogène nous ont permis de constater des variations spontanées du pouvoir pathogène.

Il est d'ailleurs curieux de noter qu'une variation également spontanée, mais d'ordre inverse, a pu être constatée en entretenant un staphylocoque sur un tube de gélose ordinaire.

A 3 reprises, deux germes différents, l'un et l'autre saprophytes, conservés durant 6 mois sur gélose nutritive ordinaire, ont brutalement acquis une aptitude pathogène élevée : c'est ainsi que la souche J. primitivement de pouvoir pathogène à peu près nul ($1/10^e$) est devenue après 12 repiquages successifs, très pathogène ($1/250^e$).

Une autre souche également saprophyte, la souche S. est passée de $1/10^e$ à plus de $1/100^e$.

Une troisième souche, également non pathogène, la souche C. ($1/10^e$) est devenue, dans un tube de culture sur gélose, assez pathogène pour provoquer une escarre dans le derme du cobaye. Les autres exemplaires de la même souche sont demeurés non pathogènes.

Il y a lieu de noter également que la souche J. a donné, elle aussi, une lésion escarrotique par inoculation dans l'épaisseur du derme du cobaye, mais que de plus cette souche est en même temps devenue dorée.

Il est donc démontré que le staphylocoque peut subir des variations spontanées non seulement au sein même de l'organisme humain, mais même *in vitro*. Cette constatation devait nous amener à étudier les causes des variations de pouvoir pathogène ainsi constatées. Cette étude va faire l'objet du troisième chapitre que nous abordons maintenant.

CHAPITRE III

Variations expérimentales de l'aptitude pathogène du staphylocoque par inoculation du germe sur une muqueuse, dans la peau, dans le sang, dans les viscères et dans une séreuse.

I. — Implantation du staphylocoque sur la muqueuse nasale.

Nous avons établi dans le chapitre précédent qu'un staphylocoque de pouvoir pathogène élevé devenait beaucoup moins pathogène après avoir végété un mois sur la muqueuse nasale de l'homme.

Expérimentalement nous avons réalisé chez le lapin le passage d'un germe très pathogène sur une muqueuse nasale saine.

Pour cela l'animal a reçu dans chaque narine V gouttes d'émulsion de staphylocoques pathogènes dans l'eau physiologique (pouvoir pathogène = 1/500^e). Au cours des 8 jours suivants l'animal a présenté une rougeur marquée de la muqueuse, mais on n'a observé ni coryza ni signes respiratoires.

Dix jours après l'instillation, le germe retiré des fosses nasales du lapin n'était doué que d'un pouvoir pathogène très faible ($1/50^e$), bien différent de son pouvoir pathogène initial ($1/500^e$).

Le même essai a été effectué avec une souche de pouvoir pathogène très faible : la souche S. dont le pouvoir pathogène est de $1/10^e$. Ce germe, un staphylocoque blanc, ensemencé sur gélose inclinée, a été émulsionné, au bout de 24 heures d'étuve à 37^o , dans 10 cc. d'eau physiologique. Dans chacune des narines d'un lapin de 2 kilogrammes, dépourvu d'immunité staphylococcique d'origine naturelle, nous avons instillé 5 gouttes de la suspension bactérienne. Au bout du quatrième jour, un prélèvement opéré sur la muqueuse nasale nous a permis de retirer le staphylocoque en culture pure, dont le pouvoir pathogène était encore de $1/10^e$.

Ces deux essais montrent que l'implantation d'un staphylocoque à la surface de la muqueuse nasale tend à diminuer le pouvoir pathogène du germe, surtout lorsque le staphylocoque est très pathogène.

Il va sans dire que nous avons vérifié avant l'expérience la flore nasale de l'animal, en particulier nous avons noté qu'elle était indemne de staphylocoques pathogènes.

II. — Inoculation du lapin par voie sous-cutanée avec une souche de staphylocoques peu pathogènes.

La souche S., de pouvoir pathogène égal à $1/10^e$, a été ensemencée sur gélose inclinée ordinaire puis

mise en suspension dans 10 cc. d'eau physiologique, après 24 heures d'étuve à 37°. Nous avons injecté 1 cc. de cette émulsion sous la peau d'un lapin neuf au niveau du flanc. Vingt-quatre heures après l'inoculation, la peau a rougi autour du point d'injection et, au second jour s'est manifesté un œdème limité.

Au quatrième jour, nous avons prélevé la sérosité qui s'était formée. Nous n'avons pas obtenu de pus franc. Cette sérosité, répartie sur gélose, a donné le même staphylocoque en culture pure. Mais lors d'une nouvelle mesure du pouvoir pathogène nous avons obtenu un titre égal à $1/250^e$ au lieu de $1/10^e$ avec la souche primitive.

Des essais opérés dans les mêmes conditions ont toujours donné des résultats semblables. A ce moment nous avons changé de souche : la souche J. de pouvoir pathogène voisin de zéro a exalté son aptitude pathogène jusqu'à $1/250^e$. A noter que nous avons toujours opéré avec les plus grandes précautions d'asepsie pour éviter toute cause de contamination accidentelle.

Il est donc démontré que l'inoculation du staphylocoque dans le tissu sous-cutané du lapin renforce considérablement le pouvoir pathogène du germe.

Forts de cette constatation, nous nous sommes demandés si après une série de passages sous-cutanés successifs, le pouvoir pathogène s'exaltait indéfiniment, ou au contraire s'il se maintenait constant après avoir atteint un seuil. A cette fin, nous avons injecté à un lapin neuf 1 cc. de la suspension prépa-

rée avec la souche J. dont le pouvoir pathogène initial était très faible. Au bout de 4 jours, nous avons prélevé 1 goutte de la sérosité formée au point d'injection ; elle renfermait du staphylocoque blanc en culture pure, de pouvoir pathogène égal à 1/100^e. Repiqué sur gélose et émulsionné dans l'eau physiologique, ce germe fut réinjecté sous la peau d'un second lapin, toujours dépourvu d'immunité naturelle. Dix passages successifs furent ainsi effectués, et, à chaque reprise nous avons fait un titrage du pouvoir pathogène.

L'expérience nous a montré que le pouvoir pathogène d'une souche initialement dénuée d'aptitude pathogène ne variait plus après avoir atteint un degré élevé, en moyenne 1/500^e au cours de nos essais.

A vrai dire nous avons pu suivre macroscopiquement cette exaltation du pouvoir pathogène. En effet le premier lapin inoculé avec la souche initiale n'a présenté au quatrième jour qu'un nodule inflammatoire limité sans pus franc. Lors des passages suivants, l'injection des germes a provoqué un gros abcès dans lequel on trouvait du pus. Toute la région avoisinante était rouge, tendue et chaude.

A ce moment nous nous sommes préoccupés de savoir si le staphylocoque voyait accroître son pouvoir pathogène dans la même proportion lorsqu'il est injecté dans la circulation du lapin.

III. — Inoculation intra-veineuse du lapin.

Pour étudier le pouvoir pathogène du staphylocoque après passage dans le sang du lapin, nous avons utilisé 2 souches différentes, l'une et l'autre de pouvoir pathogène très faible (souches F. et Corb.).

La technique employée a été identique aux techniques précédentes : culture sur gélose inclinée ordinaire pendant 24 heures ; suspension de cette culture totale dans 10 cc. d'eau physiologique ; puis injection de 1 cc. de cette suspension dans la veine marginale de l'oreille du lapin.

Quatre jours après l'injection, nous avons prélevé le sang du cœur par ponction cardiaque et nous avons fait des cultures de ce sang sur gélose ordinaire. Au cours de tous nos essais nous avons obtenu un staphylocoque en culture pure dont le pouvoir pathogène est resté analogue au taux primitif. Pour compléter l'expérience, nous avons fait 3 essais successifs avec des souches très pathogènes et nous avons pu constater que l'injection endo-veineuse n'avait pas augmenté le pouvoir pathogène. Il est vrai que dans ce cas, les lapins sont morts rapidement, les uns au bout de 24 à 30 heures, d'autres en 48 heures ou en 3 jours.

Avec une souche de pouvoir pathogène initial de $1/250^e$, l'inoculation dans le système circulatoire du lapin a fait tomber l'aptitude pathogène du germe à moins de $1/100^e$.

Le sang ne constitue donc pas un milieu d'élection pour accroître le pouvoir pathogène du staphylocoque. Il semble même au contraire atténuer ce pouvoir pathogène lorsqu'on injecte un staphylocoque de pouvoir pathogène élevé. Dès lors il était intéressant de savoir ce que devenait le pouvoir pathogène après inoculation dans différents viscères du lapin.

IV. — **Inoculation intra-viscérale du staphylocoque.**

A. — *Inoculation intra-hépatique.*

La suspension bactérienne a été préparée comme précédemment. Après une laparotomie aseptique, nous avons injecté dans un des lobes du foie d'un lapin sans immunité naturelle, 1 cc. de la suspension bactérienne. L'animal est mort rapidement et le prélèvement bactériologique des viscères n'a été effectué qu'après la mort. Dans tous les organes : foie, rate, rein, poumon et cœur, nous avons retrouvé du staphylocoque blanc, mais en aucun cas nous n'avons remarqué une altération quelconque des viscères. La souche de staphylocoque recueillie dans ces différents viscères a été titrée eu égard à son pouvoir pathogène. Alors qu'initialement la souche J. avait un pouvoir pathogène à peu près nul, la souche isolée du foie et de la rate avait un pouvoir pathogène de $1/250^e$, tandis que les germes trouvés dans le sang, dans le rein et dans le poumon avaient un pouvoir pathogène nul.

Nous avons refait cette expérience en inoculant seulement $\frac{1}{4}$ de cc. de l'émulsion bactérienne faite à partir de la même souche. L'animal, dans ces conditions, a résisté à l'inoculation. Au quatrième jour, le sang du foie, de la rate et du cœur a été prélevé et ensemencé sur gélose. Toutes ces cultures ont été positives et ont donné du staphylocoque blanc ; mais seul le staphylocoque issu du foie a accru son pouvoir pathogène jusqu'à $\frac{1}{250^e}$. Là encore, il n'y avait aucune manifestation visible de l'exaltation du pouvoir pathogène.

B. — *Inoculation intra-splénique.*

La technique employée est calquée sur la précédente. Lorsque nous avons sorti, quatre jours après l'inoculation, le germe inoculé, nous avons constaté un accroissement sensible du pouvoir pathogène, la souche J. employée étant passée de 0 à $\frac{1}{250^e}$.

Soit dit en passant, nous avons également trouvé du staphylocoque dans le tissu hépatique, dans les poumons et dans le sang ; mais seul le staphylocoque splénique s'est montré pathogène.

C. — *Inoculation intra-pulmonaire.*

Au cours de 2 essais successifs, nous avons injecté dans la région de l'apex du poumon de lapin 1 cc. de la suspension de la souche J. L'injection a été parfaitement tolérée, et les animaux ont été sacrifiés 4 jours après l'inoculation. Après ouverture du

thorax, aucune lésion du parenchyme pulmonaire n'était visible.

D'autre part, nous n'avons obtenu aucune culture après ponction du poumon et ensemencement de la sérosité.

D. — *Inoculation intra-rénale.*

L'injection a été faite d'une part, dans le parenchyme rénal lui-même, d'autre part dans la loge du rein. Comme nous allons le voir, les résultats sont très différents suivant le lieu d'injection.

1^o *Injection dans le parenchyme du rein.* — Nous nous sommes servis de lapins neufs, maintenus à la diète 24 heures après l'expérience. A la faveur d'une laparotomie aseptique, nous avons inoculé 1/4 de cc. de l'émulsion de la souche J. non pathogène, dans le pôle supérieur du rein (cette dose relativement faible a permis d'éviter une distension de la capsule rénale et l'animal a survécu). Sacrifié le quatrième jour, l'animal présentait de multiples abcès corticaux infectés par le staphylocoque, mais le titrage du pouvoir pathogène a montré que le passage du germe dans le parenchyme rénal n'augmentait que faiblement ce pouvoir : il n'est en effet passé que de 0 à 1/50^e.

2^o *Injection faite dans la loge péri-rénale.* — Nous avons fait 3 essais successifs en injectant par laparotomie aseptique 1 cc. de la suspension microbienne préparée à partir de la souche J. non pathogène.

Quatre jours après l'inoculation le rein fut à nouveau exploré par laparotomie et nous avons constaté que la capsule adipeuse était envahie de pus et recouverte par une fausse membrane. Macroscopiquement le rein était indemne. Le prélèvement de la fausse membrane, de la graisse périrénale et du pus a décelé la présence de staphylocoque blanc dont la mesure du pouvoir pathogène a donné respectivement $1/250^e$ pour le germe issu de la fausse membrane, $1/100^e$ pour le staphylocoque trouvé dans la capsule du rein, et $1/500^e$ pour la souche retirée du pus.

A noter que le sang du cœur, de la rate et du foie, chez le même animal, est resté stérile.

E. — *Inoculation intra-péritonéale.*

Pour terminer ces essais, nous avons injecté le staphylocoque dans la séreuse péritonéale. En utilisant une souche non pathogène, la souche J. et une souche très pathogène de pouvoir pathogène égal à $1/250^e$, nous n'avons obtenu aucun résultat positif. Les animaux inoculés n'ont présenté aucun épanchement et il nous fut impossible de retrouver les germes en ponctionnant le péritoine 4 jours après l'inoculation.

*
* *
*

Comment interpréter ces résultats ? Tout d'abord, un fait nous a particulièrement frappé, c'est l'exis-

tence des variations considérables du pouvoir pathogène du staphylocoque.

En effet suivant le lieu d'inoculation, ou bien le staphylocoque n'entraîne aucune perturbation ou bien il donne lieu à de véritables abcès ; cette dernière alternative s'est manifestée notamment par l'inoculation dans le tissu sous-cutané et dans la loge péri-rénale. Dans ces deux tissus, le staphylocoque a entraîné des lésions similaires, mais on est également frappé par l'identité de la structure histologique du tissu sous-cutané et de la loge péri-rénale ; l'un et l'autre sont constitués par des faisceaux conjonctifs et par un panicle adipeux important. C'est donc au sein même de ces cellules conjonctivo-adipeuses que le staphylocoque trouve les conditions nécessaires à l'exaltation de son action pathogène. Ainsi s'explique d'ailleurs la fréquence relative des suppurations staphylococciques de la loge rénale.

D'autre part, l'inoculation intra-hépatique et intra-splénique entraîne également l'élévation du pouvoir pathogène du staphylocoque, mais à un moindre degré que l'injection dans le tissu sous-cutané, ou dans l'enveloppe adipeuse du rein.

Enfin, le sang et la muqueuse nasale paraissent au contraire atténuer le pouvoir pathogène du germe.

Notons pour terminer qu'un troisième groupe de tissus semble entraver la végétation du staphylocoque ; en effet, le péritoine d'une part, le poumon

d'autre part ont en quelque sorte « digéré » la culture sans entraîner de phénomènes morbides.

En ce qui concerne le poumon, cette constatation est conforme aux expériences de L. BINET et de JAULMES qui ont montré le pouvoir bactéricide considérable de cet organe.

CHAPITRE IV

Accroissement du pouvoir pathogène d'un staphylocoque saprophyte par inoculation dans un tissu en voie d'autolyse inséré à l'animal.

Avec R. KOURILSKY et P. MERCIER, nous avons établi que le pouvoir pathogène local du staphylocoque atteignait un taux particulièrement élevé lorsque le germe était issu du pus. Par exemple, on obtient couramment des taux de $1/500^e$ à $1/2.000^e$ pour des staphylocoques recueillis à partir de furoncles ou d'anthrax.

D'autre part au cours de nos essais antérieurs, lorsque l'inoculation d'un germe peu pathogène aboutissait à la formation d'une collection purulente, nous avons noté régulièrement une exaltation du pouvoir pathogène local. En vue de déterminer le mécanisme de ce fait, nous avons imaginé en 1941 une nouvelle méthode permettant de faire apparaître et de renforcer le pouvoir pathogène des souches initialement saprophytes ou très peu pathogènes, en inoculant la suspension bactérienne soit dans une masse de foie de cobaye préalablement broyée et insérée dans le tissu sous-cutané du lapin, soit dans du pus tyndallisé.

TECHNIQUE DE LA MÉTHODE

Par laparotomie aseptique, on prélève le foie d'un cobaye neuf ; on le dépose ensuite sur des compresses stériles de manière à éliminer la plus grande partie possible du sang contenu dans cet organe. Puis le foie est placé dans un mortier stérile, broyé grossièrement avec le pilon, dilacéré en menus morceaux à l'aide de ciseaux stériles, et broyé à nouveau de façon à obtenir une véritable purée d'organe.

A ce moment on effectue un premier contrôle de stérilité du foie prélevé en ensemençant un fragment dans un tube de bouillon ordinaire. Ce milieu doit demeurer stérile après 24 heures d'étuve à 37° pour considérer que les conditions expérimentales ont été satisfaisantes.

On utilise un lapin de 2 kilogrammes environ, blanc de préférence, dont on aura au préalable dosé l'antitoxine du sérum ainsi que les agglutinines vis-à-vis du staphylocoque. Vingt-quatre heures avant l'expérience, le flanc de l'animal aura été épilé avec une solution de sulfure de baryum sec ou avec une solution de monosulfure de sodium à 33 %. Pour éviter toute lésion de grattage, les animaux sont munis d'un pansement après l'épilation.

Après désinfection soigneuse de la peau par l'alcool iodé, on incise le flanc de l'animal sur une longueur de 3 à 4 centimètres, puis on décolle à la curette ou à la sonde le tissu sous-cutané de la lame aponevrotique sous-jacente. On constitue ainsi

une sorte de poche qui reçoit environ 3 grammes de purée de foie.

A ce moment on refait un second contrôle de stérilité par culture en bouillon d'un fragment de foie. La plaie opératoire est refermée à l'aide de catgut ou bien au fil de lin, et est ensuite recouverte de collodion pour assurer une étanchéité aussi parfaite que possible.

Quelques minutes après l'opération on injecte dans la masse du foie 1 cc. de la suspension bactérienne à étudier.

Cette suspension staphylococcique est préparée à partir d'une souche de staphylocoque blanc, de pouvoir pathogène cutané très faible, et non toxigène, de la façon suivante. On cultive sur gélose nutritive inclinée pendant 24 heures à la température de 37° et on ajoute 10 cc. d'eau physiologique stérile. La culture totale est alors émulsionnée dans l'eau physiologique ; c'est cette suspension même, non diluée, qui sera injectée à l'animal, sous le volume de 1 cc.

Après l'injection la plaie est recouverte d'un pansement occlusif constitué par des compresses de gaze stériles, puis d'une bande de crêpe également stérile, élastique si possible, afin d'éviter tout danger de contamination. L'animal est alors remis en cage, seul, et son pansement est surveillé aussi rigoureusement que possible pour éviter les souillures.

Quatre jours après l'insertion du foie et l'inoculation bactérienne, le germe est « ressorti » ; pour ce faire, l'animal est placé dans un plateau stérile ;

on badigeonne de nouveau la plaie avec de l'alcool iodé et l'on pratique une boutonnière au niveau du lieu d'injection. On prélève alors à l'aide d'une anse de platine un fragment ou une goutte de la masse hépatique en voie d'autolyse ; on étale le prélèvement sur des tubes de gélose inclinée ordinaire. Ces tubes sont abandonnés 24 heures à l'étuve à 37° ; on examine au microscope le lendemain si le staphylocoque est en culture pure.

Il va sans dire qu'en cas de contamination du foie l'expérience est nulle. Toutes ces opérations doivent être exécutées dans des conditions d'asepsie rigoureuse ; la salle d'opération utilisée était uniquement employée pour des interventions expérimentales aseptiques ; l'opérateur et les assistants étaient revêtus de blouses et de gants stériles.

Lorsque l'expérience est positive, c'est-à-dire lorsque le staphylocoque a acquis une aptitude pathogène plus importante que celle qui lui avait été reconnue au départ, l'autolyse du foie est rapide, et aboutit à la formation d'une masse purulente, sanguinolente, où il est impossible de reconnaître la trame du tissu hépatique. A noter que dans presque tous les cas d'inoculation dans le parenchyme hépatique, nous avons obtenu une suppuration importante sans infection surajoutée.

A titre d'exemple, nous résumons ci-après les résultats de quelques expériences prises au hasard sur un total de 25.

TABLEAU II
Expériences du 10 février 1942.
Souche utilisée : Souche Corb.

TABLEAU III
Caractères de la souche Corb. C 1.
(Germe unique obtenu par micro-manipulation.)

	Avant transformation	Après passage sur le lapin N° 26-27-1
Dosage du pouvoir pathogène <i>in vivo</i>	1/10 ^e	1/100 ^e
Pigment.....	blanc	
Coagulase	— — — — 24 h.	++++ 4 h.
Violet cristallisé.....	colonies blanches	colonies violettes
Fermentation du manitol	pH = 7	pH = 4
Agglutination :		
Anti-sérum A....	1/20 ^e	1/250 ^e
Anti-sérum B....	1/1.000 ^e	1/50 ^e

TABLEAU IV
Caractères de la souche Corb. C 2.
(Germe unique obtenu par micro-manipulation.)

	Avant transformation	Après passage sur le lapin N° 28-29-1
Dosage du pouvoir pathogène <i>in vivo</i>	1/10 ^e	1/100 ^e
Pigment.....	blanc	blanc
Coagulase	— — — — 24 h.	++++ 4 h.
Violet cristallisé.....	colonies blanches	colonies violettes
Fermentation du manitol	pH = 7	pH = 4
Agglutination :		
Anti-sérum A....	1/20 ^e	
Anti-sérum B....	1/1.000 ^e	

TABLEAU V
Caractères de la souche Corb. C 3
 (Germe unique obtenu par micro-manipulation.)

	Avant transformation	Après passage sur le lapin N° 30-31-1
Dosage du pouvoir pathogène <i>in vivo</i>	1/10 ^e	1/250 ^e
Pigment	blanc	doré
Coagulase	— — — — 24 h.	++++ 4 h.
Violet cristallisé	colonies blanches	colonies violettes
Fermentation du mannitol	pH = 7	pH = 3-4
Agglutination :		
Anti-sérum A	1/20 ^e	1/250 ^e
Anti-sérum B	1/1.000 ^e	1/20 ^e

TABLEAU VI
Expériences du 24 mars 1942.
 Souche utilisée : Souche Corb.

TABLEAU VII
Caractères de la souche Corb. C 1.
 (Germe unique obtenu par micro-manipulation.)

	Avant transformation	Après passage sur le lapin N° 83-84-6
Dosage du pouvoir pathogène <i>in vivo</i>	1/10 ^e	
Pigment	blanc	blanc et doré
Coagulase	— — — — 24 h.	++++ 4 h.
Fermentation du mannitol	pH = 7	colonies blanches pH = 4 colonies dorées pH = 3
Hémolysine		1/50 (D. M. H.) (*)
Agglutination :		
Anti-sérum A	1/20 ^e	1/500 ^e
Anti-sérum B	1/1.000 ^e	1/50 ^e

(*) D. M. H. : Dose minima hémolytique.

TABLEAU VIII

Caractères de la souche Corb. C 2.

(Germe unique obtenu par micro-manipulation.)

	Avant transformation	Après passage sur le lapin N° 22-23-3
Pigment.....	Blanc	Blanc
Coagulase	— — — 24 h.	++++ 3 h.
Fermentation du man- nitol	pH = 7	pH = 4
Hémolysine.....		1/50 (D. M. H.)
Agglutination :		
Anti-sérum A	1/20 ^e	1/250 ^e
Anti-sérum B	1/1.000 ^e	1/100 ^e

TABLEAU IX

Caractères de la souche Corb. C 3.

(Germe unique obtenu par micro-manipulation.)

	Avant transformation	Après passage sur le lapin N° 14-71-15-38
Pigment	Blanc	Blanc
Coagulase	— — — — 24 h.	++++ 3 h.
Fermentation du man- nitol	pH = 7	pH = 4
Hémolysine.....	0 (D. M. H.)	1/100 (D. M. H.)
Agglutination :		
Anti-sérum A	1/20 ^e	1/500 ^e
Anti-sérum B	1/1.000 ^e	1/50 ^e

En principe dès le second jour un abcès se constitue avec un gros foyer inflammatoire et apparition de pus crémeux. Quelquefois, pour des raisons inconnues, l'autolyse reste partielle ; il n'y a pas

formation de pus franc, mais apparition d'une simple sérosité. Toujours dans ce cas, l'aptitude pathogène du germe inoculé est restée faible ou nulle.

A 2 ou 3 reprises nos lapins ont succombé d'une affection intercurrente (pasteurellose). Dans un cas, au bout du deuxième jour, le staphylocoque avait déjà accru son pouvoir pathogène.

Une autre série d'expériences a été faite par inoculation simultanée au lapin neuf, de 1 cc. de la même suspension bactérienne additionnée au moment même de l'injection de 1 cc. de pus rendu stérile par une tyndallisation préalable de 3 heures à 56°. La lésion évoluait pendant 4 jours, temps au bout duquel on « ressortait » le staphylocoque injecté. Son pouvoir pathogène était alors titré par la méthode habituelle *in vivo*.

Dans ces conditions on a vu se former de gros nodules inflammatoires, parfois même escarro-tiques, où le germe avait un pouvoir pathogène de 1/250^e à 1/500^e, alors qu'initialement ce même pouvoir pathogène ne dépassait pas 1/10^e.

* * *

Mais on pouvait se demander, à la suite de ces expériences, si l'acquisition des propriétés pathogènes était le fait de certaines variétés de germes existant dans la culture, initialement non pathogènes, et prenant le pas sur d'autres variétés incapables de subir cette transformation, comme

L. COTONI et J. POCHON l'ont constaté avec le pneumocoque.

Pour élucider ce point, nous avons pu obtenir grâce au micro-manipulateur de P. DE FONBRUNE une série d'éléments bactériens uniques, en les isolant à partir de diverses colonies d'une souche de staphylocoques Corb. primitivement non pathogène.

Nous saisissons cette occasion pour prier M. DE FONBRUNE d'accepter tous nos remerciements pour l'aide précieuse qu'il nous a apportée.

Les cultures entretenues sur gélose nutritive ordinaire avec chacune de ces bactéries ont été inoculées sous la peau du lapin, dans du foie nécrosé en suivant le protocole expérimental que nous venons de décrire. Quatre jours après, les souches furent retirées du foyer nécrosé et titrées quant à leur pouvoir pathogène.

Au cours de 9 essais consécutifs, nous avons obtenu un accroissement considérable de l'aptitude pathogène qui passe de moins de $1/10^e$ à un taux de $1/250^e$ et même jusqu'à un taux de $1/500^e$. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau n° X ci-dessous.

TABLEAU X

Nature de la souche	Conditions d'expérience	Fermen- tation du mannitol	Production de coaguase	Réaction du violet cristallisé	Pigment	Hémolysine (1)	Pouvoir pathogène local	Agglutination (2)
C ₁	avant passage :	pH = 7	— — — — (24 h.)	col. blanch.	col. blanch.	1/10 ^e	< 1/10 ^e	antisérum A : 1/20 ^e antisérum B : 1/1.000 ^e
	après passage : 1 ^{er} essai	pH = 4	+ + + + (3 h.)	colonies violettes aux trois essais	col. blanch. et dorées	1/50 ^e	—	antisérum A : 1/500 ^e antisérum B : 1/50 ^e
	2 ^e essai	pH = 4	+ + + + (3 h.)		col. bl.	1/50 ^e	1/250 ^e	antisérum A : 1/300 ^e antisérum B : 1/50 ^e
	3 ^e essai	pH = 4	+ + + + (3 h.)		col. dorées	—	—	antisérum A : 1/250 ^e antisérum B : 1/50 ^e
C ₂	Avant passage :	pH = 7	— — — —	col. bl.	col. bl.	0	< 1/10 ^e	antisérum A : 1/20 ^e antisérum B : 1/1.000 ^e
	après passage : 1 ^{er} essai	pH = 4	+ + + + (3 h.)	colonies violettes aux 3 essais	col. bl. et dorées aux 3 essais	1/50 ^e	—	antisérum A : 1/250 ^e antisérum B : 1/100 ^e
	2 ^e essai	pH = 4	+ + + + (3 h.)			—	1/250 ^e	antisérum A : 1/100 ^e antisérum B : 1/50 ^e
	3 ^e essai	pH = 3	+ + + + (3 h.)			1/50 ^e	—	antisérum A : 1/250 ^e antisérum B : 1/100 ^e
C ₃	avant passage :	pH = 7	— — — —	col. blanch.	col. bl.	0	< 1/10 ^e	antisérum A : 0 antisérum B : 1/1.000 ^e
	après passage : 1 ^{er} essai	pH = 4	+ + + + (3 h.)	col. viol.	col. bl. et dorées	1/50 ^e 1/100 ^e	1/500 ^e	antisérum A : 1/300 ^e antisérum B : 1/50 ^e
	2 ^e essai	pH = 3	+ + + + (3 h.)					antisérum A : 1/400 ^e antisérum B : 1/50 ^e
	3 ^e essai	pH = 5	+ + + + (24 h.)	col. légèrem. violettes	col. bl.	0	—	antisérum A : 1/330 ^e antisérum B : 1/20 ^e

(1) Dose minima hémolytique.

(2) Agglutination macroscopique, avec lecture au bout de 24 h. Se reporter pour les commentaires au chap. VI.

* * *

Il est donc possible de conférer à des staphylocoques saprophytes un pouvoir pathogène élevé. Cette transformation n'est pas due à la prédominance dans une souche déterminée d'une variété particulière de bactéries plus aptes à devenir pathogènes ; elle résulte au contraire d'une modification directe de la cellule bactérienne qui acquiert, comme nous allons le voir ultérieurement un équipement fermentaire nouveau et subit une transformation définie de ses composants antigéniques.

CHAPITRE V

Essais d'accroissement du pouvoir pathogène in vitro.

L'action stimulante du parenchyme hépatique vis-à-vis de l'accroissement du pouvoir pathogène du staphylocoque a été établi d'une manière indiscutable au cours des expériences relatées dans le précédent chapitre. Il était alors intéressant d'essayer de savoir si le foie agissait par lui-même ou si l'augmentation de l'aptitude pathogène était due à la symbiose foie-tégument du lapin.

Pour résoudre ce problème nous avons inoculé une souche non pathogène dans un fragment de foie de cobaye déposé dans un tube à essai à l'étuve à 37°. Puis, 4 jours après, la souche fut isolée du foie autolysé, repiquée sur gélose, et éprouvée par les diverses méthodes de mesure du pouvoir pathogène.

TECHNIQUES

Le foie de cobaye a été prélevé aseptiquement par laparotomie, déposé sur des compresses stériles

pour en étancher la majeure partie du sang. Un fragment de 2 à 3 grammes fut ensuite broyé et placé dans un flacon stérile contenant 10 cc. de liquide de Ringer, dont la formule est la suivante :

Chlorure de sodium.....	6	grammes
Chlorure de potassium	0,075	grammes
Chlorure de calcium.....	0,10	grammes
Bicarbonate de sodium.....	0,10	grammes
Eau distillée..... q. s.p.	1.000	grammes

Le flacon fut laissé 4 jours à l'étuve à 37° après avoir étéensemencé avec 1 cc. de la suspension bactérienne. Cette dernière était préparée en ajoutant 10 cc. d'eau physiologique à la culture totale de la souche F. dont le pouvoir pathogène initial était de 1/10^e. Quatre jours après l'ensemencement, cette souche fut isolée et repiquée sur gélose ordinaire. Les épreuves de la fermentation du mannitol et de la coagulase ont été négatives. D'autre part l'agglutination par les anti-sérums A et B a donné les résultats suivants : 1/20^e avec l'anti-sérum A et 1/1.000^e avec l'anti-sérum B. Pour des raisons d'ordre technique la recherche de l'hémolysine n'a pu être effectuée. Nous pouvons donc conclure que dans ces conditions il n'a pas été possible d'accroître le pouvoir pathogène *in vitro*.

Dans une seconde expérience, nous avons remplacé le liquide de Ringer par le milieu synthétique de G. RAMON, A. BOIVIN et R. RICHOU, dont nous avons rappelé antérieurement la préparation. Là encore l'expérience fut absolument négative puisque

le mannitol, la coagulase, et le dosage du pouvoir pathogène *in vivo* ont montré que la souche n'avait pas varié dans ses propriétés fermentaires ni dans sa constitution antigénique.

Enfin en troisième lieu, nous avons ensemencé 1 cc. de la suspension F. dans du foie de cobaye broyé, sans addition de milieu de culture spécial. Les résultats obtenus ont encore été négatifs.

Il est donc prouvé qu'en utilisant un tel protocole expérimental, il est impossible au staphylocoque d'accroître son pouvoir pathogène sans l'intervention du tégument animal. Devant l'échec de cette méthode, nous avons cherché à réaliser un accroissement de l'aptitude pathogène *in vitro*, en utilisant d'autres souches et en se servant d'autres supports qui nous avaient permis *in vivo* d'accroître le pouvoir pathogène. A cet effet nous avons inoculé 3 souches différentes dans du pus préalablement tyndallisé.

TECHNIQUES

Nous nous sommes servis de pus streptococcique provenant d'un abcès humain, et préalablement tyndallisé par un chauffage discontinu de 3 heures à 56°. La stérilité du pus a été vérifiée à la fois en aérobiose et en anaérobiose. Il fut réparti dans 3 tubes à raison de 1 cc. par tube.

Puis nous avons préparé les suspensions bactériennes à partir des souches Will., Corb. et Cart, isolées des fosses nasales de l'homme. A leur sortie

de l'organisme humain ces staphylocoques avaient un pouvoir pathogène compris entre 0 et 1/10^e (méthode de dosage *in vivo*).

La fermentation du mannitol était négative ; d'autre part ces souches ne produisaient ni ferment coagulant, ni hémolysine } enfin, elles n'étaient agglutinées que par l'anti-sérum B, agglutinant des germes non pathogènes. Nous avons ensemencé 1 cc. de ces 3 suspensions dans chacun des tubes de pus. Les mélanges furent placés à l'étuve à 37° pendant 4 jours, et les souches furent isolées sur gélose ordinaire.

Elles furent alors testées par les méthodes caractéristiques de l'aptitude pathogène. Les résultats obtenus après passage dans le pus sont consignés dans le tableau n° XI suivant :

TABLEAU XI Essais d'accroissement du pouvoir pathogène par culture du staphylocoque dans du pus.			
Tests de pathogénèse	Souche Will.	Souche Corb.	Souche Cart.
Pouvoir pathogène (méthode <i>in vivo</i>)	0	1/10 ^e	0
pH de la culture en eau peptonée mannitée.....	7	7	7
Coagulase au bout de 24 h...	0	0	0
Agglutination :			
Anti-sérum A	1/20 ^e	1/20 ^e	1/20 ^e
Anti-sérum B	1/500 ^e	1/500 ^e	1/500 ^e

L'expérience a été répétée à deux reprises différentes, mais en aucun cas nous n'avons obtenu la transformation des diverses souches non pathogènes utilisées en souches pathogènes.

* * *

Nous avons alors renoncé à effectuer des essais de transformation du pouvoir pathogène *in vitro* avec des substances qui avaient accru le pouvoir pathogène grâce au passage dans l'organisme animal.

C'est pourquoi nous avons orienté nos recherches d'accroissement du pouvoir pathogène *in vitro* en utilisant des milieux de culture se rapprochant autant que possible de produits trouvés dans les abcès à staphylocoques chez l'homme. Nous avons utilisé en particulier, les leucocytes de cheval, le sérum de cheval, puis, empiriquement, nous avonsensemencé le staphylocoque dans le lait cru et dans l'urine filtrée.

TECHNIQUES

I. — *Film leucocytaire.*

Nous avons choisi le sang de cheval qui permet d'obtenir un film leucocytaire important. A cet effet nous avons prélevé aseptiquement 20 cc. de sang d'un cheval normal ; le sang fut centrifugé pendant 30 minutes à 6.000 tours par minute. Le sérum fut décanté et le film leucocytaire a pu être obtenu en quantité assez importante, approxima-

tivement 70 milligrammes. Ce film leucocytaire fut dilué dans 10 cc. d'eau peptonée à 2 %.

Le milieu ainsi préparé futensemencé avec le staphylocoque non pathogène, souche Corb., et placé pendant 4 jours à l'étuve à 37°. D'autre part, ce même milieuensemencé avec la même souche a été débarrassé de l'air en le soumettant à l'action de la trompe à vide. Après fermeture du tube au chalumeau, toujours sous vide, la culture fut également laissée à la température de 37° pendant 4 jours.

II. — *Sérum de cheval.*

Le sérum décanté lors de l'expérience précédente fut réparti en deux tubes, après avoir subi un contrôle de stérilité. Ces deux tubes furentensemencés avec la souche Corb. non pathogène.

L'un des tubes fut cultivé en aérobiose et l'autre en anaérobiose, à 37° pendant 4 jours.

III. — *Culture du staphylocoque dans l'urine.*

Nous avons filtré 20 cc. d'urine sur bougie Chamberland L 3 après avoir contrôlé le pH ($\text{pH} = 5,6$). Ici encore nous avons réalisé 2 cultures, l'une en aérobiose, l'autre en anaérobiose, avec la souche Corb. non pathogène.

IV. — *Culture du staphylocoque dans le lait.*

Nous avons utilisé le lait cru, non stérilisé, non pasteurisé et non filtré. Avant l'expérience nous

avons constaté l'absence de staphylocoques pathogènes. Nous avons réparti 20 cc. de ce lait dans deux tubes qui furent ensemencés et cultivés comme précédemment.

RÉSULTATS

Tous les tubes placés en anaérobiose furent ouverts 4 jours après l'ensemencement. La souche de staphylocoque fut isolée de chacun de ces milieux ; nous lui avons fait subir deux tests de pathogénèse : fermentation du mannitol et recherche de la coagulase. *Les deux tests furent négatifs quel que soit le milieu de culture utilisé.*

Pour les cultures en aérobie, nous avons isolé le staphylocoque Corb. au bout de 3, 5, 7 et 15 jours après l'ensemencement. Les germes obtenus furent soumis également aux deux épreuves précédentes de pathogénèse.

Les résultats sont condensés dans le tableau n° XII suivant :

Les deux essais précédents réalisés à la fois en aérobie et en anaérobiose ont donc été entièrement négatifs.

* * *

Nous avons recommencé l'expérience quelques jours plus tard en modifiant quelque peu les milieux de culture offerts à la souche non pathogène.

Dans deux tubes différents, numérotés I et II, nous

TABLEAU XII

Examen des souches cultivées en aérobiose.

Origine de la souche ensemencée et nature des milieux de culture	Examen de la souche après :					
	3 jours		5 jours		7 jours	
	f. m. (1)	coag. (2)	f. m. (1)	coag. (2)	f. m. (1)	coag. (2)
Souche Corb. + leucocytes de cheval et eau peptonée	5-6	—	6	—	5	—
Souche Corb. + sérum de cheval.....	7	—	7	—	7	—
Souche Corb. + urine humaine	7-8	—	7	—	7	—
Souche Corb. + lait cru.....	7	—	7	—	7	—

(1) f. m. = Epreuve de la fermentation du mannitol. Les chiffres ci-dessus représentent le pH de la culture mesuré par l'indicateur universel.

(2) coag. = Epreuve de la coagulase. Le signe (— — —) indique que la réaction est entièrement négative.

avons placé 1 cc. de sérum de lapin, 3/10^e de centimètre cube d'un mélange de leucocytes et de sérum de lapin, et 0,60 grammes de foie de cobaye prélevé stérilement.

Dans deux autres tubes différents, numérotés III et IV, nous avons mélangé 1 cc. de sérum de lapin, 0,60 grammes de foie de cobaye stérile et 1 cc. d'une solution d'aneurine et d'acide nicotinique. Cette solution de facteurs de croissance offerte au staphylocoque était ainsi préparé :

Acide nicotinique.....	20 milligrammes
Aneurine.....	1 milligramme
Eau.....	500 cc.

Cette solution fut répartie en tubes de 10 cc. et stérilisée 40 minutes à 110°-115°.

Chacun de ces tubes futensemencé avec 1 cc. d'une suspension de la souche Corb. en eau physiologique. Ils furent placés 4 jours à l'étuve à 37° ; à ce moment, les germesensemencés furent isolés. Ici encore nous n'avons utilisé que la fermentation du mannitol et la recherche de la coagulase comme tests de pathogénèse. Quel que soit le milieu, la coagulase a toujours été absente et l'eau peptonée mannitée a conservé un pH voisin de 7.

Ces expériences ont donc été à nouveau entièrement négatives.

* * *

Pour compléter l'expérience, nous avons répété le premier protocole expérimental, c'est-à-dire en-

semencement de la même souche Corb. non pathogène avec un film leucocytaire de cheval, du sérum de cheval, de l'urine filtrée et du lait cru. Les cultures effectuées en aérobiose et en anaérobiose pendant 4 jours nous ont donné un staphylocoque blanc, n'entraînant pas la fermentation du mannitol et ne donnant pas non plus de ferment coagulant.

* * *

Ces 3 séries d'expériences ont donc échoué. En aucun cas nous n'avons pu obtenir une transformation, même ébauchée, du staphylocoque vers l'aptitude pathogène.

CHAPITRE VI

Etude des propriétés fermentaires et antigéniques des souches ayant subi une variation quelconque de pouvoir pathogène.

Après avoir exposé les diverses méthodes qui nous ont permis d'observer des variations dans le taux du pouvoir pathogène du staphylocoque, variations soit spontanées soit expérimentales, nous allons maintenant soumettre tous les germes ayant subi une variation de leur pouvoir pathogène, aux différentes épreuves proposées pour caractériser les staphylocoques pathogènes.

Jusqu'à présent nous avons uniquement considéré comme test de la pathogénie, la méthode biologique de titrage de R. KOURILSKY et P. MERCIER ; mais il était indispensable de comparer cette méthode de titrage aux autres épreuves. De plus, élargissant le problème envisagé primitivement, nous allons pouvoir comparer entre elles toutes les épreuves de pathogénèse non seulement à l'égard des souches transformées, mais également vis-à-vis de staphylocoques initialement saprophytes ou pathogènes.

Ainsi nous aurons réalisé un double but ; tout

d'abord de sélectionner les tests de pathogénie, et d'autre part de contrôler si nos souches saprophytes avaient bien acquis après transformation tous les caractères des staphylocoques pathogènes.

I. — Pigment et titrage *in vivo*.

Avant de faire varier le pouvoir pathogène, nous avons examiné le pigment de 35 souches de staphylocoque, fraîchement isolées pour la plupart ; puis nous avons titré leur aptitude pathogène chez le lapin.

Sur ces 35 souches, 23 étaient blanches et 12 dorées. Ces dernières étaient issues d'infections humaines très variées : furoncles, anthrax, abcès, ostéomyélites, ou étaient simplement hébergées dans les fosses nasales antérieures de sujets apparemment indemnes de staphylococcie, mais véritables porteurs de germes. Le titrage du pouvoir pathogène de ces 12 staphylocoques dorés a montré qu'il s'agissait toujours de germes pathogènes puisque nous avons obtenu des taux de pathogénie variant de $1/100^e$ à plus de $1/2.000^e$.

Par contre, sur les 23 souches de staphylocoque blanc, 4 seulement étaient douées de pouvoir pathogène élevé, de $1/250^e$ à $1/500^e$. Le pigment doré n'est donc pas un caractère absolu de l'aptitude pathogène des staphylocoques, car les staphylocoques blancs eux-même peuvent être hautement pathogènes. Rappelons d'ailleurs que les auteurs alle-

mands ont constaté ce fait depuis longtemps. D'autre part, le staphylocoque isolé par F. M. BURNET, lors des accidents survenus en Australie à la suite d'une vaccination anti-diphtérique à l'aide du mélange toxine-antitoxine, était un staphylocoque blanc. Enfin, dans plusieurs cas de septicémie staphylococcique, on a trouvé par hémoculture, sans conteste possible, des staphylocoques blancs.

Tout au plus est-on en droit de présumer que les staphylocoques blancs sont habituellement peu ou pas pathogènes, mais il importe de confirmer leur activité par des méthodes autres que l'étude du pigment pour s'assurer de leur pathogénèse. Comme nous l'avons montré dans les pages qui précèdent, il est possible d'augmenter dans de fortes proportions le pouvoir pathogène de staphylocoques primitivement très faiblement pathogènes, en les inoculant sous la peau du lapin, dans le foie ou la rate de cet animal ou encore en associant aux germes des substances accroissant l'inflammation et stimulant l'immunité, telles que R. KOURILSKY et P. MERCIER les ont proposées en 1940.

Enfin, nous venons de voir qu'en injectant la suspension staphylococcique non pathogène dans une masse de tissu broyé en voie d'autolyse, nous obtenions un accroissement de l'activité pathogène du staphylocoque.

Dans ces conditions que devient le pigment des souches ayant subi l'augmentation du pouvoir pathogène ?

Sur 22 essais de transformation, nous avons obtenu à 4 reprises différentes le « virage » de la souche F. initialement blanche. C'est notamment l'inoculation dans le tissu hépatique en voie d'autolyse qui a entraîné une variation dans la pigmentation de cette souche. Dans des essais tout récents effectués avec la souche Corb. nous sommes parvenus à faire apparaître le pigment doré, toujours par inoculation dans le tissu hépatique en voie d'autolyse. Enfin, grâce au micro-manipulateur de P. de FONBRUNE, nous avons isolé de cette même souche 3 éléments bactériens uniques que nous avons appelé C_1 ; C_2 ; C_3 . Tous les trois étaient blancs avant transformation. Après culture dans le parenchyme hépatique broyé, un seul de ces germes a été retrouvé blanc ; les deux autres présentaient à la fois des colonies blanches et dorées, ou bien uniquement des colonies dorées, mais ce dernier cas exceptionnellement.

Il est nécessaire de rappeler que la « sortie » de ces germes dans toutes nos expériences a eu lieu de 4 à 8 jours seulement après l'inoculation à l'animal : il est permis de supposer ou bien que le virage de la souche devenue plus pathogène est lent à se produire, ou bien qu'il est subordonné à des conditions de culture : aérobieuse, qualité du milieu de culture, etc... qui nous échappent. Quoi qu'il en soit, la pigmentation d'une souche de staphylocoque n'est pas un caractère constant de son activité pathogène.

II. — Présence d'hémolysine et pouvoir pathogène.

Nous considérerons successivement la présence ou l'absence de l'hémolysine dans les diverses souches étudiées avant, puis après les variations du pouvoir pathogène. Nous considérerons aussi le taux de l'hémolysine pour les nombreux échantillons de staphylocoques que nous avons isolés sans chercher à faire varier leur pouvoir pathogène.

Quatorze souches issues de lésions staphylococciques en évolution ont été ensemencées en vue de déterminer si elles produisaient de l'hémolysine ; dix d'entre elles ont été cultivées sur milieu Taylor et quatre sur le milieu synthétique de G. RAMON, A. BOIVIN et R. RICHOU. Treize souches sur quatorze étaient hémolytiques, avec une dose minima hémolytique variant de $1/100^e$ à $1/250^e$. Pour les filtrats hautement toxiques, nous avons également recherché la dose combinée hémolytique qui était comprise entre 1 cc. et 0,30 cc. Toutes ces souches, prélevées à partir d'infections staphylococciques en évolution, se sont montrées pathogènes pour l'animal, le pouvoir pathogène local ayant donné des taux compris entre $1/250^e$ et $1/1.000^e$. *Une seule souche issue d'un abcès à staphylocoques n'a donné aucune trace d'hémolysine bien qu'elle eût un pouvoir pathogène de $1/1.000^e$.*

Par ailleurs nous avons recherché la dose minima hémolytique de 5 staphylocoques non pathogènes et cultivés en atmosphère de gaz carbonique, sur bouillon Taylor. Une seule souche a donné une trace

d'hémolysine au taux de $1/10^e$. L'hémolysine est donc présente dans la presque totalité des souches pathogènes, mais la teneur en hémolysine n'est pas absolument parallèle au pouvoir pathogène local. Nous avons vu en effet des germes ayant une aptitude pathogène relativement faible pour la peau du lapin ($1/250^e$) présenter une dose minima hémolytique de $1/2.500^e$, alors que des staphylocoques de pouvoir pathogène beaucoup plus élevé ($1/1.000^e$ et même $1/2.000^e$) ne donnent que peu d'hémolysine (dose minima hémolytique = $1/100^e$).

Ces résultats confirment ceux que P. MERCIER a relatés en 1939 dans une étude de 400 échantillons de staphylocoques. Cet auteur a trouvé que l'hémolysine est une propriété très générale du staphylocoque, puisqu'on la trouve non seulement chez des germes issus d'infections humaines ou animales, mais encore chez des souches saprophytes ou prélevées dans le milieu extérieur. Par exemple, une souche isolée de l'eau en Indochine, a donné une toxine élevée, de l'ordre de 8-10 unités.

La comparaison de l'activité hémolytique et de l'aptitude pathogène locale a été complétée au cours d'essais de variations du pouvoir pathogène effectués selon les méthodes décrites plus haut. Une des souches expérimentées, le staphylocoque F., blanc, avait un pouvoir pathogène très faible ($1/10^e$) et le filtrat obtenu après 6 jours de culture sur bouillon Taylor en atmosphère de gaz carbonique, ne contenait aucune trace d'hémolysine. Ce germe a été inoculé à l'animal en présence de tanin et d'autre

part injecté dans du tissu hépatique autolysé. Après avoir laissé les lésions évoluer pendant 4 jours, les souches « ressorties » ont étéensemencées sur bouillon Taylor en vue de rechercher leur activité hémolytique. Après inoculation avec le tanin, la souche avait conservé une dose minima hémolytique très faible ($1/10^e$) ; par contre, la dose minima hémolytique atteignit $1/100^e$ après passage dans le foie autolysé inséré sous la peau du lapin (2 essais).

Avec la souche Corb. cultivée en milieu Taylor, nous avons obtenu une trace d'hémolysine avant le passage à l'animal ($1/10^e$), et après accroissement de son activité pathogène, le taux de l'hémolysine s'est élevé à $1/50^e$, et même à $1/100^e$ au cours d'un essai. Dans le même temps le pouvoir pathogène local passait de moins de $1/10^e$ à $1/500^e$.

Ces résultats établissent deux faits : tout d'abord il est possible à un staphylocoque non hémolytique d'acquérir, en faible quantité il est vrai, l'hémolysine. D'autre part cette propriété est loin d'être acquise par tous les germes, malgré un protocole d'expérience identique. Un tiers à peine de nos essais nous a donné une épreuve positive avec l'hémolysine.

La propriété hémolytique du staphylocoque paraît donc s'acquérir assez difficilement, et seulement dans des conditions favorables impossibles à préciser jusqu'ici. Il convient cependant de remarquer que pour produire l'hémolysine il est nécessaire de rechercher le milieu de culture le plus approprié au germe. Notons en effet que pour la préparation usuelle de la toxine staphylococcique, le milieu

synthétique de G. RAMON, A. BOIVIN et R. RICHOU donne avec la souche Wood. une hémolysine beaucoup plus riche que le bouillon Taylor. On observe le fait inverse avec la souche 72 de Nelis. Cette difficulté d'acquisition de l'hémolysine s'observe surtout avec la technique que nous avons employée : culture en milieu spécial et en atmosphère de gaz carbonique. Si l'on se limite à explorer la même propriété sur plaque de gélose au sang, comme l'ont fait la majorité des auteurs, on constate qu'un nombre très important de souches se montre hémolytique et que cette propriété est très répandue ; mais peu de bactéries se montrent capables de devenir bonnes productrices d'hémolysine, avec la méthode utilisée tout au moins.

Ajoutons que dans les diverses expériences de renforcement du pouvoir pathogène il nous est arrivé à 6 reprises de provoquer l'acquisition du pouvoir dermo-nécrotique ; lors du titrage du pouvoir pathogène chez le lapin, la propriété dermo-nécrotique apparaissait alors qu'elle était absente auparavant, sur les papules déterminées par la dilution au $1/10^e$ (3 cas), et dans 3 autres cas sur des papules obtenues avec une dilution au $1/100^e$.

Le parallélisme avec le pouvoir hémolytique n'a pu être étudié en raison des difficultés matérielles.

III. — Fermentation des matières sucrées et pouvoir pathogène.

En 1903, GORDON a démontré l'aptitude des souches pathogènes à faire fermenter certaines ma-

TABEAU XIII
Essais de fermentation des matières sucrées.

Matière sucrée	Nature de la souche	Pouvoir pathogène de la souche au moment de l'essai	pH de la culture au bout de :		
			2 jours	4 jours	6 jours
Glucose	Souche Corb. avant transformation	1/10 ^e	3	3	3
	Souche Berg. initialement pathogène	1/1.000 ^e	3	3	3
	Souche Corb. C2 après transformation	1/250 ^e	3	3	3
	Souche Corb. C3 après transformation	1/250 ^e	3	3	3
Lévilose	Souche Corb. avant transformation	1/10 ^e	3	3	3
	Souche Berg. initialement pathogène	1/1.000 ^e	3	3	3
	Souche Corb. C2 après transformation	1/250 ^e	3	3	3
	Souche Corb. C3 après transformation	1/250 ^e	3	3	3
Galactose	Souche Corb. avant transformation	1/10 ^e	3	3	3
	Souche Berg. initialement pathogène	1/1.000 ^e	3	3	3
	Souche Corb. C2 après transformation	1/250 ^e	3	3	3
	Souche Corb. C3 après transformation	1/250 ^e	3	3	3
Arabinose	Souche Corb. avant transformation	1/10 ^e	6,5	7	7
	Souche Berg. initialement pathogène	1/1.000 ^e	7	9	9
	Souche Corb. C2 après transformation	1/250 ^e	7	7	7
	Souche Corb. C3 après transformation	1/250 ^e	7	7	7
Xylose	Souche Corb. avant transformation	1/10 ^e	7	9	8
	Souche Berg. initialement pathogène	1/1.000 ^e	7	7	6
	Souche Corb. C2 après transformation	1/250 ^e	7	7	7
	Souche Corb. C3 après transformation	1/250 ^e	7	7	7

Matière sucrée	Nature de la souche	Pouvoir pathogène de la souche au moment de l'essai	pH de la culture au bout de :		
			2 jours	4 jours	6 jours
Saccharose	Souche Corb. avant transformation	1/10 ^e	3	3	3
	Souche Berg. initialement pathogène	1/1.000 ^e	3	3	3
	Souche Corb. C2 après transformation	1/250 ^e	3	3	3
	Souche Corb. C3 après transformation	1/250 ^e	3	3	3
Lactose	Souche Corb. avant transformation	1/10 ^e	3	3	3
	Souche Berg. initialement pathogène	1/1.000 ^e	3	3	3
	Souche Corb. C2 après transformation	1/250 ^e	3	3	3
	Souche Corb. C3 après transformation	1/250 ^e	4	4	4
Maltose	Souche Corb. avant transformation	1/10 ^e	3	3	3
	Souche Berg. initialement pathogène	1/1.000 ^e	3	3	3
	Souche Corb. C2 après transformation	1/250 ^e	3	3	3
	Souche Corb. C3 après transformation	1/250 ^e	3	3	3
Amidon soluble	Souche Corb. avant transformation	1/10 ^e	4	3	5
	Souche Berg. initialement pathogène	1/1.000 ^e	4	3	6
	Souche Corb. C2 après transformation	1/250 ^e	6	6	6
	Souche Corb. C3 après transformation	1/250 ^e	5-6	5	6
Inuline	Souche Corb. avant transformation	1/10 ^e	7	7	8
	Souche Berg. initialement pathogène	1/1.000 ^e	7	9	8
	Souche Corb. C2 après transformation	1/250 ^e	7	7	7
	Souche Corb. C3 après transformation	1/250 ^e	7	7	7
Mannitol	Souche Corb. avant transformation	1/10 ^e	7	7	8
	Souche Berg. initialement pathogène	1/1.000 ^e	3	3	3
	Souche Corb. C2 après transformation	1/250 ^e	3	3	3
	Souche Corb. C3 après transformation	1/250 ^e	5	5	5

tières sucrées et, en particulier le mannitol. Ses travaux ont été confirmés plus tard par WINSLOW, en 1920 et DUDGEON en 1927. Il nous a paru intéressant de rechercher si le mannitol était fermenté *non seulement par les souches initialement pathogènes, mais également par des souches rendues pathogènes par un des procédés que nous avons étudiés*. D'autre part, abordant le problème sur une échelle plus vaste, nous avons étudié la fermentation de plusieurs autres sucres pour les confronter avec l'épreuve au mannitol.

Dans ces essais 4 souches furent cultivées en milieu sucré, c'est-à-dire une souche non pathogène, une souche initialement pathogène et enfin deux souches devenues pathogènes après passage dans le foie autolysé inséré sous la peau du lapin. La fermentation de ces matières sucrées a été considérée simplement sous l'angle de l'acidité du milieu de culture au bout d'un laps de temps variable après l'ensemencement.

Nous avons rassemblé dans le tableau N° XIII ci-dessous les résultats obtenus au cours de ces recherches. Il démontre clairement que le mannitol seul est régulièrement attaqué par les staphylocoques pathogènes, alors que les staphylocoques saprophytes ne le font pas fermenter. Aucune des autres matières sucrées examinées n'a permis d'établir une distinction entre staphylocoques saprophytes et staphylocoques pathogènes.

Au cours de la plupart de nos essais de transformation du pouvoir pathogène, nous avons utilisé comme test de pathogénèse la fermentation du mannitol. D'autre part, nous avons confronté cette méthode avec la production de coagulase. Pour la clarté de l'exposé, les résultats obtenus sont condensés dans deux tableaux : le premier tableau, tableau N° XIV, résume les propriétés fermentaires de différentes souches de staphylocoques dont le pouvoir pathogène était connu ; dans le second tableau, tableau N° XV, sont réunies les propriétés fermentaires des staphylocoques qui ont subi une augmentation de pouvoir pathogène.

TABLEAU XIV
Propriétés fermentaires
des différentes souches de pouvoir pathogène connu
(ces souches n'ont pas été transformées)

Numéro des souches	Provenance des souches	Pouvoir pathogène local	Fermentation du mannitol	Production de coagulase
72	Gorge (angine)	1/250 ^e	++++	++++ 1 h.
Wood.	Souche toxigène	1/250 ^e	++++	++++ 1/2 h.
Fourn.	Nez (saprophyte)	1/10 ^e	-----	----- 24 h.
Bidd.	Furoncle (face)	1/500 ^e	++ ++	++++ 2 h.
Ben.	Septicémie	1/500 ^e	++++	++++ 2 h.
Will.	Nez (saprophyte)	0	-----	----- 24 h.
Glom.	Nez (saprophyte)	0	-----	----- 24 h.
Nicol.	Nez (porteur de germes)	1/250 ^e	+ + + +	+ + + + 1 h.
Cart.	Nez (saprophyte)	0	-----	----- 24 h.
Nogar.	Nez (saprophyte)	0	-----	----- 24 h.
Fraz.	Nez (porteur de germes)	1/250 ^e	++++	++++ 1 h.
Fourt.	Furoncle	1/500 ^e	++++	++++ 1 h.

TABLEAU XV
**Propriétés fermentaires des différentes souches
ayant subi une augmentation du pouvoir pathogène**

Numéro des souches (1)	Nature de l'expérience	Pouvoir patho- gène	Fermen- tation du mannitol (2)	Production de coagulase (3)
Fourn.	Souche initiale	1/10 ^e	— — — —	— — — — après 24 h.
Fourn.	Histamine <i>in vivo</i>	1/100 ^e	+ + — —	+ + + + après 24 h.
Fourn.	Tanin <i>in vivo</i>	1/50 ^e	+ + — —	+ — — — après 24 h.
Fourn.	Toxine staphylococ- cique <i>in vivo</i>	1/100 ^e	+ + + —	+ + + — après 24 h.
Fourn.	Leucocytes <i>in vivo</i>	1/200 ^e	+ + + +	+ + + — après 24 h.
Fourn.	Foie <i>in vivo</i>	1/500 ^e	+ + + +	+ + + — après 18 h.
Will.	Souche initiale	1/10 ^e	— — — —	— — — — après 24 h.
Will.	Foie <i>in vivo</i>	1/500 ^e	+ + + +	+ + + + après 4 h.

(1) Ces souches nous ont été obligeamment prêtées par M. le Docteur R. KOURILSKY.

(2) Fermentation du mannitol :

+ + + + = pH 3-4
+ + + — = pH 5
+ + — — = pH 6
— — — — = pH 7-8

(3) Production de coagulase :

+ + + + = coagulation complète
+ + + — = coagulation partielle
+ — — — = début de coagulation
— — — — = pas de coagulation

Les deux tableaux qui précèdent ont montré un parallélisme étroit entre les deux épreuves de pathogénèse *in vitro*, c'est-à-dire fermentation du mannitol et production de coagulase d'une part, et le dosage *in vivo* du pouvoir pathogène cutané mesuré par la méthode des dilutions croissantes chez le lapin, d'autre part. Il nous semble même en ce qui concerne le ferment coagulant que plus le pouvoir

pathogène du staphylocoque est élevé, plus rapide est la coagulation du plasma oxalaté. C'est ainsi qu'avec des taux d'aptitude pathogène voisins de $1/1.000^e$ la coagulation est obtenue en moins d'une heure. Au contraire avec des germes moins actifs, la coagulation n'est totale qu'au bout de 24 heures. D'autre part, la série d'expériences résumées dans le second tableau (tableau N° XV) montre qu'un germe non pathogène initialement, ne faisant en particulier ni fermenter le mannitol ni coaguler le plasma oxalaté, peut acquérir ces diverses propriétés lorsqu'il est placé dans des conditions favorables, et en particulier quand il végète dans le derme au sein d'éléments tissulaires en voie de nécrose.

IV. — Réaction du violet cristallisé et pouvoir pathogène.

Notre étude sur cette réaction a été répartie en deux phases. Nous avons tout d'abord étudié l'action des staphylocoques saprophytes et pathogènes *non transformés* sur la gélose au violet cristallisé ; puis dans un second temps nous avons, avec la même épreuve, caractérisé l'activité de staphylocoques rendus pathogènes par les diverses méthodes précédemment exposées.

Dans la première série de nos essais, dix souches ont été examinées ; cinq d'entre elles étaient pathogènes (leur aptitude pathogène variait de $1/500^e$ à $1/1.000^e$). Sur ces cinq échantillons, trois dorés,

cultivés sur gélose au violet cristallisé à 1/400.000^e, ont donné après 24 heures d'étuve à 37° des colonies dorées pourvues d'une aréole violette, tandis que les deux autres, des staphylocoques blancs pathogènes, ont montré des colonies entièrement violettes.

Au contraire les cinq staphylocoques blancs non pathogènes n'ont donné naissance qu'à des colonies blanches ou très faiblement teintées en violet.

Dans la seconde série de nos essais, nous avons éprouvé nos souches transformées devenues pathogènes, par la réaction au violet cristallisé. Les résultats ont été absolument identiques à ceux obtenus avec les souches initialement pathogènes ; bien que notre expérience n'ait porté que sur sept souches, il est possible de considérer la réaction au violet cristallisé comme une épreuve aussi fidèle que la fermentation du mannitol et la production de coagulase.

V. — Agglutination et pouvoir pathogène.

Nous avons obtenu six immunsérums en vaccinant des lapins neufs avec des souches toxigènes, pathogènes ou saprophytes. Les sérums agglutinaient différemment les staphylocoques pathogènes et les staphylocoques non pathogènes. C'est ainsi que les quatre sérums préparés par injection de staphylocoques soit pathogènes, soit toxigènes, agglutinent non seulement les staphylocoques homologues, c'est-à-dire ayant servi à préparer les sérums correspondants, mais également tous les germes pathogènes.

Au contraire, ils restent sans action vis-à-vis des germes saprophytes. Ces derniers ne sont agglutinés que par les sérums préparés avec des germes non pathogènes.

Les quatre premiers sérums obtenus avec des souches pathogènes ont été réunis dans le groupe A. Les seconds sont classés dans le groupe B.

A l'aide de ces deux groupes de sérums, nous avons recherché le taux d'agglutination de staphylocoques n'ayant pas subi la moindre variation de pouvoir pathogène. Les résultats obtenus par l'agglutination directe sont condensés dans le tableau suivant (tableau N° XVI) :

TABLEAU XVI
Taux d'agglutination de staphylocoques
dont le pouvoir pathogène est connu

Nature du sérum	Origine de la souche	Taux du pouvoir pathogène de la souche	Taux d'agglu- tination
Sérums agglutinant les staphylocoques A pathogènes :			
Anti-72.....	Homologue 72 (toxi- gène)	1/250 ^e	1/10.000 ^e
Anti-72.....	Berg. pathogène	1/1.000 ^e	1/10.000 ^e
Anti-Berg.	Berg. pathogène	1/1.000 ^e	1/5.000 ^e
Anti-Berg.	72 toxigène	1/250 ^e	1/10.000 ^e
Anti-Berg.	Gors. pathogène	1/1.000 ^e	1/10.000 ^e
Anti-Berg.	Fourn. non pathogène	1/10 ^e	1/20 ^e
Anti-Berg.	Will. non pathogène	0	1/50 ^e
Sérum agglutinant les staphylocoques B non pathogènes :			
Anti-Fourn.	Berg. pathogène	1/1.000 ^e	1/20 ^e
Anti-Fourn.	Fourn. homologue	1/10 ^e	1/10.000 ^e
Anti-Fourn.	Corb. non pathogène	1/10 ^e	1/1.000 ^e
Anti-Fourn.	72 toxigène	1/250	1/20 ^e

Ce tableau permet de considérer l'agglutination directe comme une épreuve particulièrement favorable pour caractériser les staphylocoques pathogènes sur une base antigénique.

Il était tout indiqué de rechercher si les germes rendus pathogènes avaient acquis des composants antigéniques leur permettant d'être agglutinés par les inimmun-sérums du groupe A. D'autre part, il était intéressant de savoir s'ils conservaient des constituants antigéniques du groupe B. Le tableau N° XVII suivant donne une réponse relativement nette à ce problème.

TABLEAU XVII
**Taux d'agglutination de staphylocoques
après transformation.**

Nature du sérum	Origine de la souche (1)	Taux du pouvoir pathogène de la souche	Taux d'aggluti- nation
Sérum anti-A	Fourn. + tanin <i>in vivo</i>	1/100 ^e	1/20 ^e
Sérum anti-B	Fourn. + tanin <i>in vivo</i>	1/100 ^e	1/1.000 ^e
Sérum anti-A	Fourn. + foie <i>in vivo</i>	1/500 ^e	1/100 ^e
Sérum anti-B	Fourn. + foie <i>in vivo</i>	1/500 ^e	1/100 ^e
Sérum anti-A	Fourn. + alun <i>in vivo</i>	1/500 ^e faible	1/250 ^e
Sérum anti-B	Fourn. + alun <i>in vivo</i>	1/500 ^e faible	1/500 ^e
Sérum anti-A	Fourn. + foie <i>in vivo</i>	1/500 ^e	1/100 ^e
Sérum anti-B	Fourn. + foie <i>in vivo</i>	1/500 ^e	1/1.000 ^e
Sérum anti-A	Corb. + foie <i>in vivo</i>	1/100 ^e	1/100 ^e
Sérum anti-B	Corb. + foie <i>in vivo</i>	1/100 ^e	1/100 ^e
Sérum anti-A	Will. + foie <i>in vivo</i>	1/250 ^e	1/200 ^e
Sérum anti-B	Will. + foie <i>in vivo</i>	1/250 ^e	1/100 ^e

(1) Ces souches nous ont été aimablement prêtées par M. le Docteur R. KOURILSKY.

Il convient de remarquer que dans plusieurs des essais, le taux d'agglutination du staphylocoque primitivement peu pathogène a diminué avec l'anti-sérum B (staphylocoques saprophytes) tandis qu'elle a augmenté avec l'anti-sérum A (staphylocoques pathogènes), et cela après avoir acquis un pouvoir pathogène élevé (de $1/10^e$ jusqu'à $1/500^e$).

Dans des essais très récents effectués à l'aide des souches également non pathogènes (souches Corb. C₁, C₂, C₃) agglutinées primitivement par l'anti-sérum B, nous avons constaté que celles-ci étaient devenues fortement agglutinées par l'anti-sérum A après accroissement de leur pouvoir pathogène. En même temps l'agglutination avec les mêmes souches transformées, par l'anti-sérum B, non pathogène, s'est affaiblie d'une manière considérable. Nous avons donné antérieurement les résultats des taux d'agglutination obtenus avec les souches qui ont accru leur pouvoir pathogène par culture *in vivo* dans les tissus en voie d'autolyse. C'est à ce chapitre (chapitre IV, p. 46) que l'on trouvera les résultats complets de cette expérience dont nous ne rapportons ici que ce qui a trait à l'agglutination.

En conclusion il est possible de considérer l'agglutination comme une épreuve fidèle pour caractériser les espèces pathogènes du staphylocoque, et d'autre part notre étude montre que, dans un temps relativement court, le staphylocoque saprophyte devenu pathogène a acquis des composants antigéniques nouveaux.

CONCLUSIONS

De l'ensemble de nos expériences, il ressort plusieurs faits essentiels que nous pouvons résumer rapidement ainsi :

I. — Tout d'abord des variations spontanées du pouvoir pathogène du staphylocoque peuvent exister non seulement dans l'organisme, mais également en milieu de culture artificiel.

Lorsqu'un staphylocoque pathogène végète sur les muqueuses nasales, il perd rapidement son aptitude pathogène. C'est une variation inverse que l'on peut parfois observer en milieu gélosé où un staphylocoque primitivement saprophyte peut acquérir un pouvoir pathogène élevé sans que l'on puisse en discerner les raisons.

II. — L'inoculation d'un staphylocoque peu pathogène dans le tissu sous-cutané du lapin et dans la loge péri-rénale, constitués l'un et l'autre par un tissu conjonctivo-adipeux, augmente d'une manière sensible le pouvoir pathogène du germe.

L'inoculation dans le foie et la rate entraîne également une augmentation de pouvoir pathogène, quoiqu'à un moindre degré. Par contre l'inoculation

dans le sang et l'implantation sur la muqueuse nasale paraissent atténuer le pouvoir pathogène du staphylocoque.

Un troisième groupe de tissus entrave la végétation du staphylocoque ; ce sont : une séreuse, le péritoine et un viscère, le poumon, qui « digèrent » en quelque sorte la culture du staphylocoque inoculé.

III. — L'inoculation d'un staphylocoque saprophyte dans un tissu en voie de nécrose inséré dans l'hypoderme du lapin entraîne d'une manière constante l'accroissement du pouvoir pathogène.

Cette augmentation n'est pas due à la prédominance dans une souche d'une variété particulière de germes plus aptes que d'autres à devenir pathogènes. Tous les éléments bactériens participent à l'accroissement du pouvoir pathogène comme nous avons pu le démontrer en utilisant le micro-manipulateur de P. DE FONBRUNE.

IV. — Tous les essais de transformation de staphylocoques saprophytes en milieux artificiels ont échoué, même en essayant de se rapprocher le plus possible des manifestations physiologiques du staphylocoque.

V. — Des méthodes très simples permettent de caractériser la pathogénèse du staphylocoque. Ces méthodes consistent dans la fermentation du mannitol, l'épreuve de la coagulase et la réaction du violet cristallisé. Les fermentations obtenues avec les

matières sucrées autres que le mannitol ne nous ont pas permis de différencier les germes saprophytes des germes pathogènes.

En outre, la propriété hémolytique et la pigmentation de la souche ne constituent pas des facteurs absolus de l'aptitude pathogène ; tout au plus peut-on dire que les staphylocoques dorés et hémolytiques sont presque toujours des germes pathogènes.

D'autre part, il est démontré que l'agglutination directe peut servir à classer les staphylocoques en deux groupes :

Groupe A pour les staphylocoques pathogènes ;

Groupe B pour les staphylocoques non pathogènes. Nous n'avons pas rencontré jusqu'ici les variantes C et O décrites par THOMPSON et KHORAZO.

Enfin, grâce à la méthode d'inoculation *in vivo*, avec insertion de tissu en voie d'autolyse, le passage des souches non pathogènes à l'état pathogène s'accompagne de l'acquisition des propriétés fermentaires et antigéniques propres aux seuls staphylocoques pathogènes.

BIBLIOGRAPHIE

- BIGGER (J.-W.), 1933. — The production of staphylococcal haemolysin with observations on its mode of action. *J. Path. Bact.*, 36, 87-114.
- BIGGER (J. W.), BOLAND (C. R.) and O'MEARA (R. A. Q.), 1927. — A new method of preparing staphylococcal haemolysin. *J. Path. Bact.*, 30, 271-277.
- BINET (L.) et JAULMES (Ch.), 1938. — Poumon et microbe. *Presse médicale* du 24 août 1939.
- BIRCH-HIRSCHELD (L.), 1933-34. — Ueber die Wirksamkeit der Extrakte von auf Zellophanagar gezüchteten Staphylokokken. *Z. Immunitätsf.*, 81, 260-285.
- BLAIR (J. E.), 1937. — Rationale of toxoid therapy in staphylococcal infections, with reference to serologic grouping of staphylococci. *J. Bact.*, 35, 52.
- BLAIR (J. E.), 1938. — The stability of biological and biochemical properties of staphylococci. *J. Bact.*, 35, 52.
- BLAIR (J. E.), 1939. — The pathogenic staphylococci. *Bact. Rev.*, t. 3, juin 1939, 97-146.
- BLAIR (J. E.) and HALLMANN (F. A.), 1935-36. — Staphylococcal anti-haemolysin in osteomyelitis and other staphylococcal infections. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 33, 382-386.
- BLAIR (J. E.) and HALLMANN (F. A.), 1938. — Serologic grouping of staphylococci. *J. Bact.*, 31, 81-82.

- BRYCE (L. M.) and ROUNTREE (P. M.), 1936. — The production of toxin by staphylococci. *J. Path. Bact.*, 43, 173-189.
- BURNET (F. M.), 1929. — The exotoxin of staphylococcus pyogenes aureus. *J. Path. Bact.*, 32, 717-734.
- BURNET (F. M.), 1930. — The production of staphylococcal toxin. *J. Path. Bact.*, 33, 1-16.
- BURNET (F. M.), 1931. — The interactions of staphylococcus toxin-antitoxin. *J. Path. Bact.*, 34, 471-492.
- BURNET (F. M.) and FREEMAN (M.), 1932. — The process of formol detoxification; experiments with purified staphylococcal toxin. *J. Bact.*, 29, 437-448.
- CHAPMAN (G. H.), 1936. — Specificity of the dye in the crystal-violet agar reaction of staphylococci. *J. Bact.*, 32, 199-205.
- CHAPMAN (G. H.) and BERENS (C.) and CURCIO (L.) and NILSON (E. L.), 1937. — The pathogenic staphylococcus: its isolation and differentiation from non-pathogenic types. *J. Bact.*, 35, 646.
- CHAPMAN (G. H.) and BERENS (C.), 1935. — Crystal-violet agar as a differential medium for staphylococci. *J. Bact.*, 29, 437-448.
- CHAPMAN (G. H.), BERENS (C.), CURCIO (L.) and NILSON (E. L.), 1937. — The differentiation of pathogenic staphylococci from non-pathogenic types. *J. Bact.*, 35, 311-334.
- CHAPMAN (G. H.), BERENS (C.), PETERS (A.) and CURCIO (L.), 1934. — Coagulase and haemolysin tests as measures of the pathogenicity of staphylococci. *J. Bact.*, 28, 343-363.
- CHAPMAN (G. H.), LIEB (C. W.), BERENS (C.) and CURCIO (L.), 1937. — The isolation of probable pathogenic staphylococci. *J. Bact.*, 33, 533-543.

- COWAN (S. T.), 1938. — The classification of staphylococci by precipitation and biological reactions. *J. Path. Bact.*, 46, 31-45.
- CRUIKSHANK (R.), 1937. — Staphylocoagulase. *J. Path. Bact.*, 45, 293-303.
- DARANYI (J. V.), 1926. — Pathogenität und Einteilung der Staphylokokken. *Zentr. Bakt. Parasitenk. I. Orig.*, 99, 74-79.
- DUDGEON (L. S.), 1908. — The differentiation of the staphylococci. *J. Path. Bact.*, 12, 242-257.
- DUDGEON (L. S.), and SIMPSON (J. W. H.), 1928. — On the differentiation of the staphylococci, with special reference to the precipitin reactions. *J. Hyg.*, 27, 160-175.
- DURAN-REYNALS (F.), 1933. — Studies on a certain spreading factor existing in bacteria and its significance for bacterial invasiveness. *J. Explt. Med.*, 58, 161-181.
- FISHER (A. M.), 1936. — The plasma-coagulating properties of staphylococci. *Bull. Johns. Hopkins. Hosp.*, 59, 393-414.
- FRAENKEL (C.) und BAUMANN, 1905. — Ueber Hemolysinsbildung und Agglutination der Staphylokokken. *Munch. Med. Woch.*, t. 52, 937.
- GEISS, 1914. — *Zeitschr. F. Hyg.*, t. 76, 281.
- GENGOU (O.), 1930. — Contribution à l'étude des poisons élaborés par les staphylocoques. *Arch. Intern. Med. Explt.*, 5, 633-639.
- GENGOU (O.), 1933. — Contribution à l'étude de l'action du staphylocoque sur le plasma oxalaté et sur le fibrinogène. *Ann. Institut Pasteur*, 51, 14-31.
- GORDON (M.), 1905-1906. — Characters by which streptococci and staphylococci may be differentiated and identified. *Report of medical office local govern. board. appendice. B. N° 7*, 543.

- GRATIA (A.), 1919. — Action diverse des microbes sur la coagulation du sang. *C. R. Soc. Biol.*, t. 82, 1245-1247.
- GRATIA (A.), 1919. — A propos de la coagulation du plasma oxalaté par le staphylocoque (Transformation du prosérozyme en sérozyme). *C. R. Soc. Biol.*, t. 82, 1247-1250.
- GRATIA (A.), 1920. — Nature et genèse de l'agent coagulant du staphylocoque ou « staphylocoagulase ». *C. R. Soc. Biol.*, t. 85, 584-585.
- GROSS (H.), 1927. — Ueber Virulenz und Virulenz-prüfungsmethoden von Staphylokokken. *Klin. Wochenschr.*, 6, 2281-2283.
- GROSS (H.), 1931. — Der Plasmagerinnungsstoff der Staphylokokken. *Zentr. Bakt. Parasitenk. I. Orig.*, 122, 354-361.
- HALLMAN (F. A.), 1937. — Pathogenic staphylococci in the anterior nares; their incidence and differentiation. *Proc. Soc. Explt. Biol. Med.*, 36, 789-794.
- HINE (T. G. M.), 1922. — Serological classification of the staphylococci. *Lancet*, 2, 1380-1382.
- HOLMAN (W. L.), 1935. — Studies on staphylococci. *Am. J. Med. Sci.*, 189, 436-450.
- HOPKINS (J. G.) and BARRIE (N.), 1927-28. — Antigenic relationships of certain strains of staphylococcus aureus as shown by agglutinin absorption. *Proc. Soc. Explt. Biol. Med.*, 25, 701-702.
- JULIANELLE (L. A.), 1922. — Studies of haemolytic staphylococci. Haemolytic activity. Biochemical reactions. Serologic reactions. *J. Infectious Diseases*, t. 31, 256-284.
- JULIANELLE (L. A.), 1937. — Determination of staphylococcal types by fermentation of mannite. *Proc. Soc. Explt. Biol. Med.*, 36, 117-119.
- JULIANELLE (L. A.) and WIEGHARD (C. W.), 1933-34. — Im-

munological specificity of carbohydrates derived from staphylococci. *Proc. Soc. Explt. Biol. Med.*, 31, 947-949.

JULIANELLE (L. A.) and WIEGHARD (C. W.), 1935. — The immunological specificity of staphylococci. I: The occurrence of serological types. *J. Explt. Med.*, 62, 31-37.

JULIANELLE (L. A.) and WIEGHARD (C. W.), 1935. — The immunological specificity of staphylococci. III : Inter-relationships of cells constituents. *J. Explt. Med.*, 62, 31-37.

KOCH (J.), 1908. — *Zeitschr. F. Hyg.*, t. 58, 287.

KOURILSKY (R.) et MERCIER (P.), 1940-41. — I : Etude sur l'infection staphylococcique chez l'homme. Variation du pouvoir pathogène du staphylocoque suivant son habitat.

— II : Etude expérimentale sur les variations du pouvoir pathogène du staphylocoque.

— III : Etude sur les variations du pouvoir pathogène du staphylocoque (Constatations histo-pathologiques). *Rev. Immunol.*, t. 6, Nos 1, 2, 5, p. 17, 116-291.

KOURILSKY (R.) et MERCIER (P.), 1941. — Les variations du pouvoir pathogène du staphylocoque suivant son habitat. *C. R. Soc. Biol.*, t. 135, 16.

— Etude expérimentale sur les variations du pouvoir pathogène du staphylocoque. *C. R. Soc. Biol.*, t. 135, 159.

— Etude expérimentale du pouvoir pathogène du staphylocoque. Constatations histo-pathologiques. *C. R. Soc. Biol.*, t. 135, 803.

— Action sur le pouvoir pathogène du staphylocoque de diverses substances augmentant l'inflammation et stimulant l'immunité. *C. R. Soc. Biol.*, t. 135, 1270.

— Influence de différents éléments de l'inflammation

- sur le pouvoir pathogène cutané du staphylocoque. *C. R. Soc. Biol.*, t. 135, 1267.
- Variations du pouvoir pathogène du staphylocoque par inoculation dans les tissus en voie d'autolyse. *C. R. Soc. Biol.*, t. 135, 1267.
- Variations du pouvoir pathogène local du staphylocoque sous l'influence des nécroses cutanées par agents biologiques et physiques. *C. R. Soc. Biol.*, t. 135, 1421.
- KOURILSKY (R.), MERCIER (P.), MONIN (M.) et de FONBRUNE (P.), 1942. — Transfert d'une souche de staphylocoque non pathogène obtenue à partir d'une bactérie unique dans le groupe des pathogènes. *Soc. Biol.*, séance du 27 juin 1942.
- KOLLE und OTTO, 1902. — *Zeitschr. Hyg.*, 41, 369.
- KUTSCHER und KONRICH, 1904. — Untersuchungen über die Beziehungen von Hemolysinbildung und Agglutinabilität der Staphylokokken. *Zeitschr. F. Hyg.*, 48, 249.
- MUCH (H.), 1908. — Ueber eine Vorstufe der Fibrinfermentes in Kulturen von Staphylokokkus aureus. *Biochem. Z.*, 14, 143-155.
- Mc. FARLAN (A. M.), 1938. — Incidence of pathogenic staphylococci in the nose. *Brit. Med. J.*, 2, 939-941.
- NEISSER und WECHSBERG, 1901. — Ueber das Staphylotoxin. *Zeitschr. F. Hyg.*, 36, 299.
- NICOLLE (M.) et CESARI (E.), 1914. — I. Etude sur les staphylocoques dorés. II : Toxicité des échantillons étudiés dans le travail précédent. Vue d'ensemble sur les staphylocoques dorés. *Ann. Institut Pasteur*, 28, 219-232.
- PANTON (P. N.) et VALENTINE (F. C.), 1932. — Staphylococcal toxin. *Lancet*, t. 1, 506.
- PIKE (R. M.), 1934. — The depression of phagocytosis products of staphylococci. *J. Imm.*, 26, 69.

- PROESCHER, 1903. — Ueber die künstliche Immunität gegen Staphylokokken. *Centralb. Bakt. I. Orig.*, 34, 437-445.
- RAMON (G.), BOIVIN (A.), RICHOU (R.), 1938. — *C. R. Acad. des Sciences*, (séance du 29 août).
- RAMON (G.), MERCIER (P.), POCHON (J.), AMOUREUX (G.), 1942. — *C. R. Soc. Biol.*, t. 135, p. 329.
- THOMPSON (L.), 1932. — Morphologie and cultural study of staphylococci with special reference to source. *Am. J. Clin. Path.*, 2, 125-134
- THOMPSON (L.) and KHORAZO (D.), 1937. — Correlated antigenic and biochemical properties of staphylococci. *J. Bact.*, 34, 69-79.
- THYGESON (P.), 1938. — Mannitol fermentation as an indicator conjonctival pathogenicity of staphylococci. *Arch. Ophtalmol.*, 20, 274-275.
- VAN DURME, 1903. — *Hyg. Rundschau*, t. 13, 66.
- VAN DE VELDE (H.), 1894. — Etude sur le mécanisme de la virulence du staphylocoque pyogène. *La cellule*, 10, 403-460.
- VERVEY, 1940. — A type specific antigenic protein derived from the staphylococci. *J. Explt. Med.*, t. 71, 636.
- WIEGHARD (C. W.) and JULIANELLE (L. A.), 1935. — The immunological specificity of staphylococci. II : The chemical nature of the soluble specific substances. *J. Explt. Med.*, 62, 23-30.
- WINSLOW (C. E. A.), HOTHBERG (W.) and PARSONS (B. I.), 1920. — Notes on the classification of the white and orange staphylococci. *J. Bact.*, 5, 145-167.
- WRIGHT (J.), 1936. — Staphylococcal leucocidin (Neisser-Wechsberg type) and anti-leucocidin. *Lancet*, 1, 1002-1004.
-

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ

Rapports entre les Staphylocoques pathogènes et les Staphylocoques non pathogènes

Vu : le Président de la thèse,
J. RÉGNIER.

Vu : Le Doyen,
de la Faculté de Pharmacie de Paris
Paris, le 7 décembre 1942.
A. DAMIENS.

Vu et permis d'imprimer :
le Recteur de l'Académie de Paris,
G. GIDEL.

